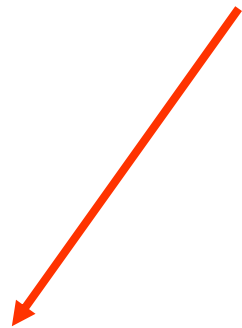
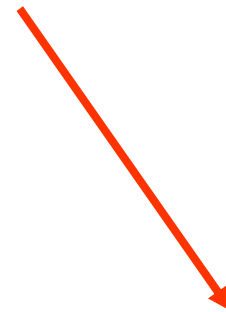


A che servono le piante transgeniche?



Ricerca di base



Applicazioni

Ricerca di base

Favorire la comprensione e lo studio del ruolo fisiologico di molti geni

Come si studia la funzione di un gene?

❖ Mutazioni del gene → effetto sul fenotipo

- genetica forward (tradizionale)
- genetica reverse (inversa)

❖ Aumento dell'espressione del gene

- sovraespressione costitutiva
ectopica

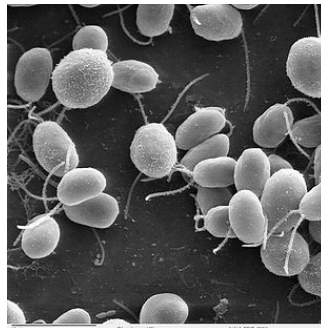
❖ Riduzione/silenziamento del gene

- antisenso
- RNAi

Utilizzo di sistemi modello



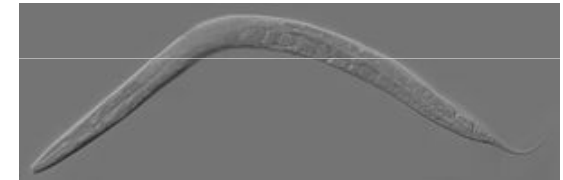
*Drosophila
melanogaster*



*Chlamydomonas
reinhardtii*



*Danio rerio
(zebrafish)*



Caenorhabditis elegans



Mus musculus



Arabidopsis thaliana

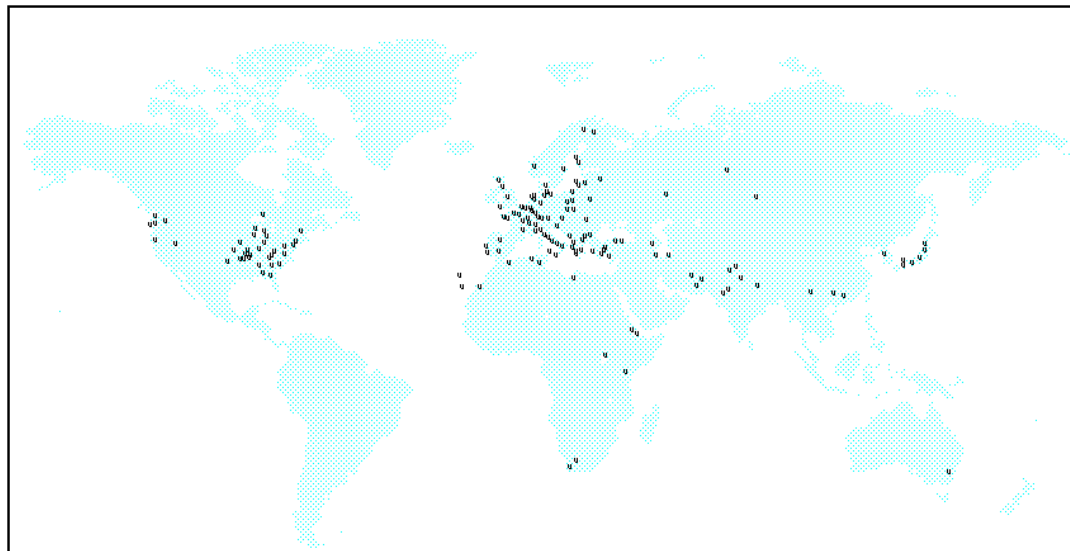
Arabidopsis thaliana

Pianta modello

Arabidopsis thaliana è stata scoperta da Johannes Thal nel sedicesimo secolo. Proposta come pianta modello già da Laibach nel 1943 e studiata più in dettaglio da Redei nel 1970

Origine Europa

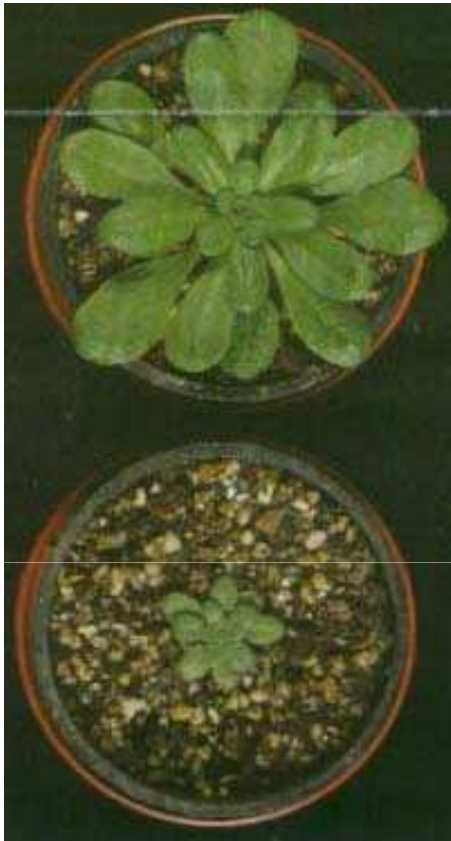
Distribuita in Europa, Asia, Nord-America



Geographical distribution of ecotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH.

© Jonathan Clarke





Ciclo vitale: 6 settimane

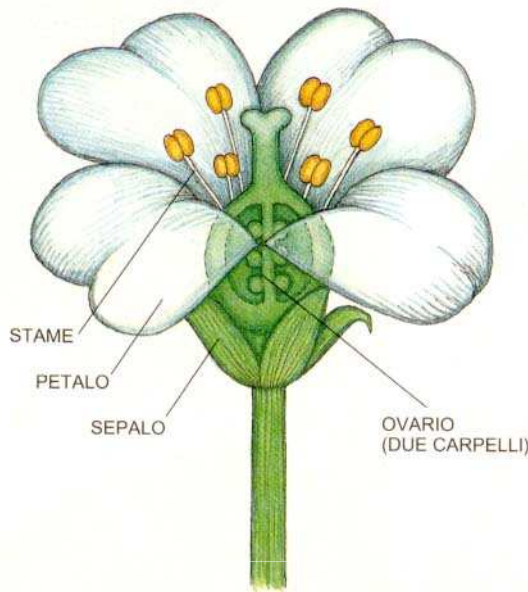
I germogli si formano dopo 3 settimane dalla germinazione

Rosetta: Ø 2-10 cm (a seconda delle condizioni di crescita)

Produce infiorescenze

4 sepal
4 petali
6 stami (2 corti, 4 lunghi)

I fiori maturi sono lunghi
approssimativamente 2-3
mm e larghi 0.5-1 mm



Autofecondazione

(cross-fecondazione possibile
in laboratorio applicando il
polline sulla superficie dello
stigma)

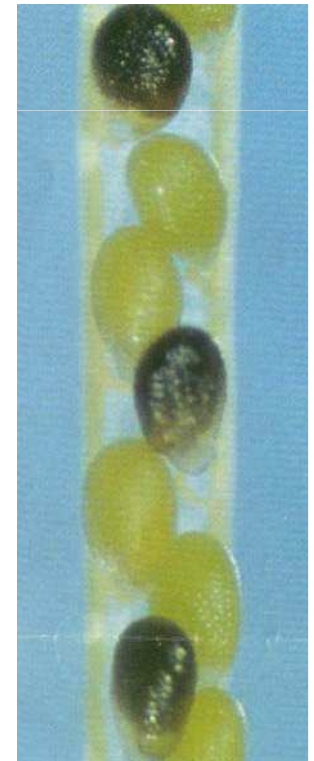
In seguito a fecondazione
gli ovari si allungano in
frutti chiamati **silique**



Può contenere a maturità
(dopo 2 settimane dalla
fecondazione)

30-60 semi

Un seme pesa 20 μg ed è lungo
poche centinaia di μm



L'importanza dei sistemi modello

Puya raimondii è un pessimo sistema modello: fiorisce ogni 100 anni e raggiunge i 10 metri di altezza. Non si conosce nulla della sua genetica e del suo genoma.



Arabidopsis thaliana è un buon sistema modello: fiorisce dopo 1 mese, raggiunge i 30-50 centimetri di altezza e cresce bene in laboratorio.

Arabidopsis pianta modello

PERCHE'?



GENOMA PICCOLO

5 cromosomi
contenuto aploide 125 Mb

- circa 25500 geni
- 35% geni unici



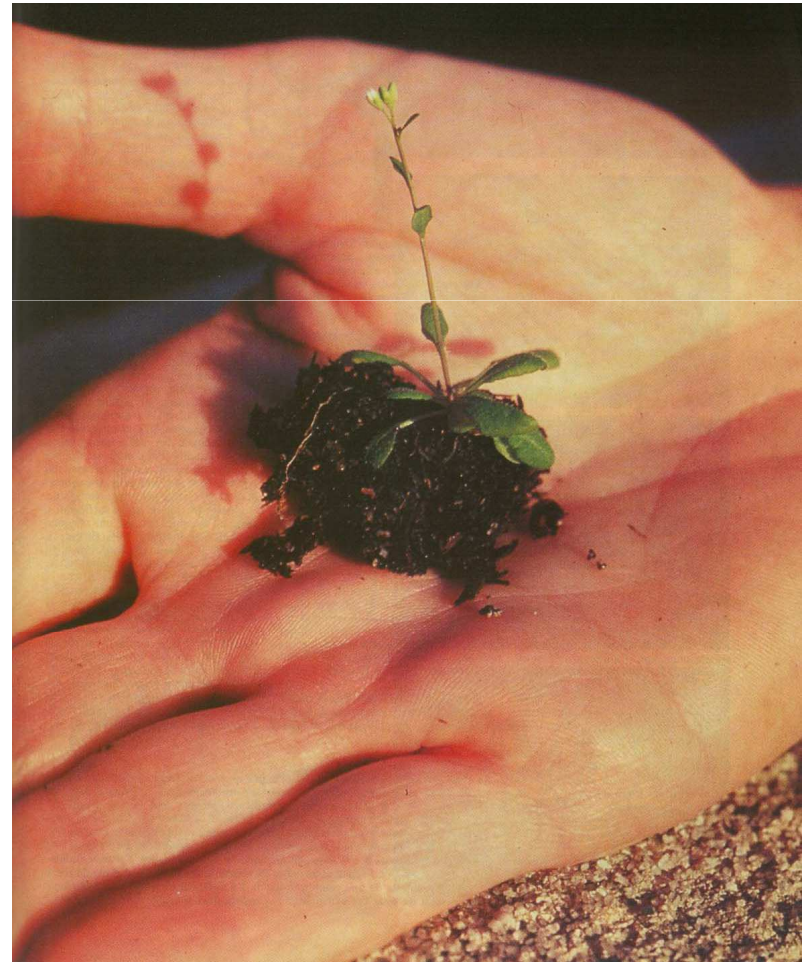
RAPIDO CICLO VITALE

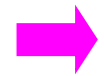
6 settimane da seme a seme



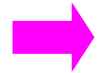
PICCOLE DIMENSIONI

facile coltivazione in spazi ristretti
10000 semi possono germinare in una
singola piastra Petri
1 pianta cresce in 1 cm²





**Da una pianta si possono ottenere
> 5000 semi**



**facilmente trasformabile con
alta efficienza**

QUINDI:

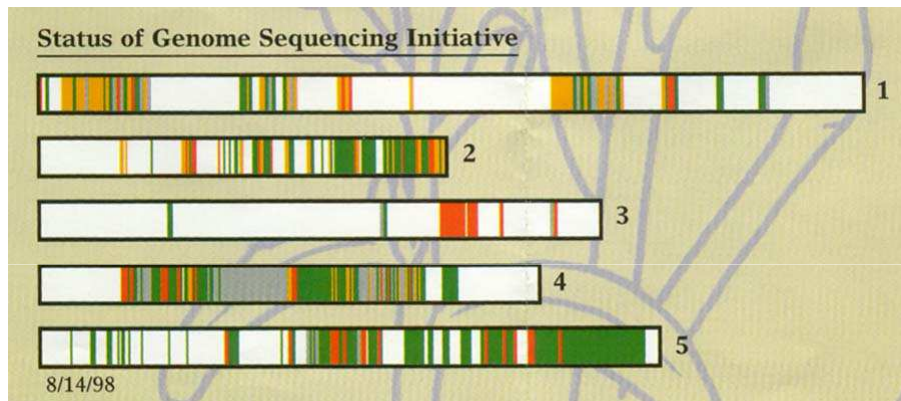
- ampia disponibilità di banche YAC, BAC, etc.
- disponibilità di marcatori molecolari e genetici
- numerose collezioni di mutanti chimico/fisici
- numerose collezioni di mutanti inserzionali

PROGETTO AGI

Arabidopsis Genome Initiative

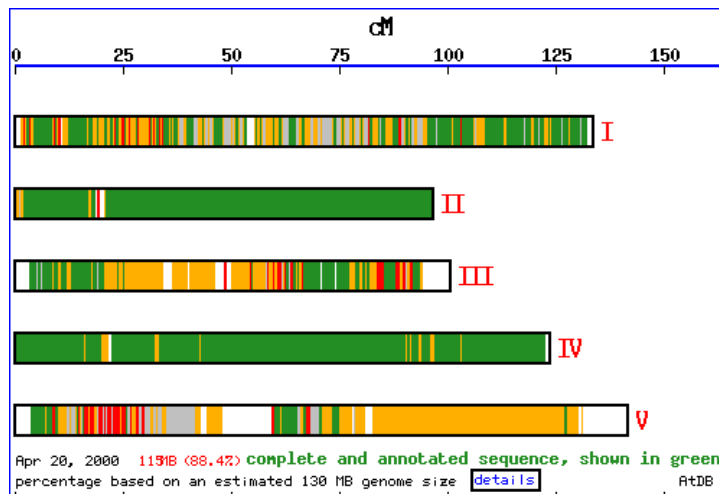
1996 INIZIO PROGETTO

DICEMBRE 2000
SEQUENZIAMENTO COMPLETATO



1998

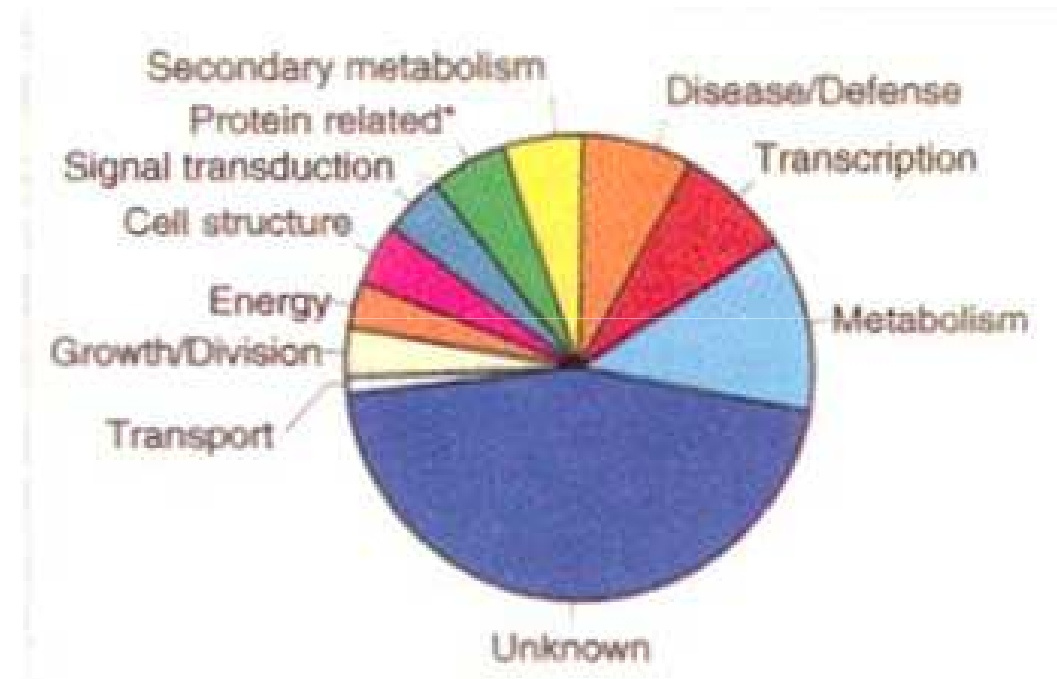
verifica dei cloni
library in preparazione o
sequenza in atto
sequenze preliminari
rilasciate in banca dati
sequenze complete
rilasciate in banca dati



Maggio
2000

Conoscere la sequenza di un gene non sempre significa conoscere anche la funzione di quel gene

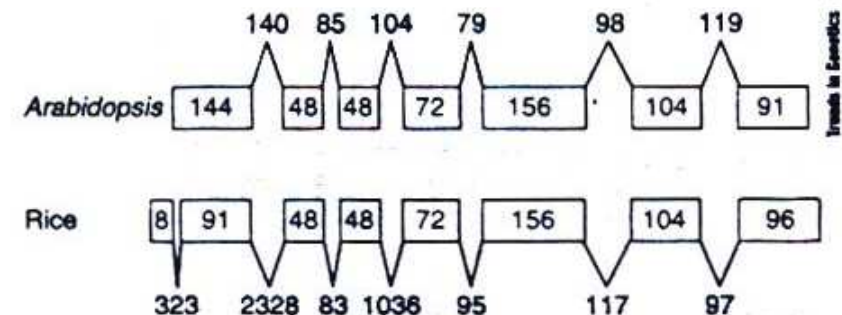
Il 54% dei geni può essere assegnato a una determinata categoria funzionale sulla base della similarità con proteine e motivi noti (maggio 2000)



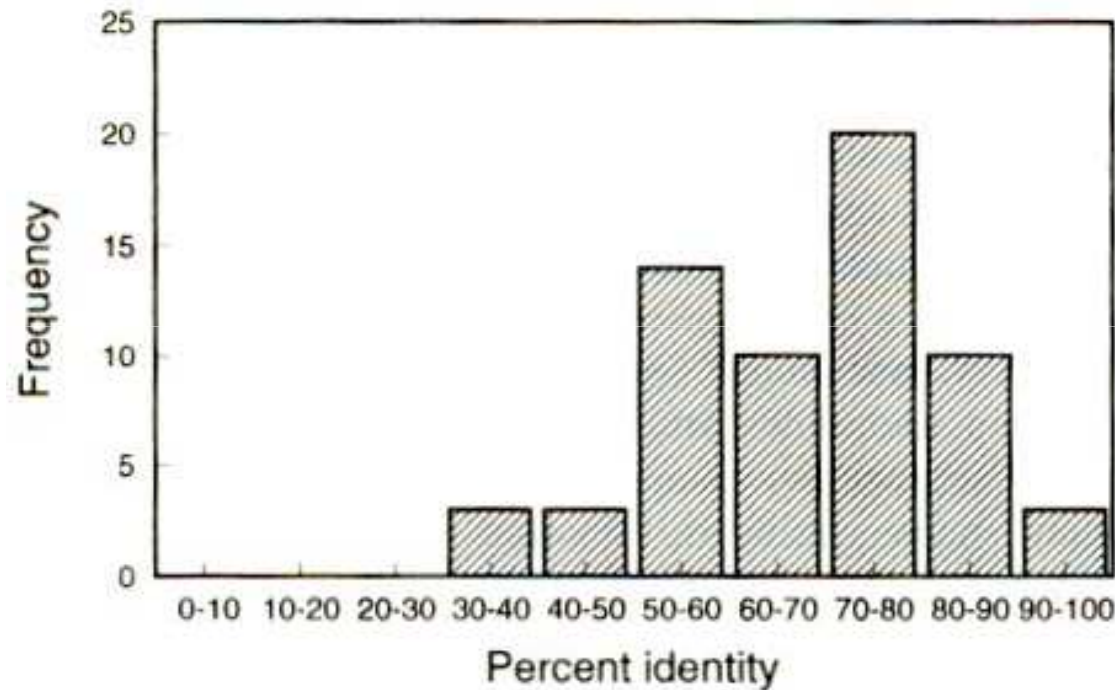
In *Arabidopsis* i geni sono distribuiti in tutto il genoma.
Nei cereali sono raggruppati in cluster (gene space) che sono separati da zone di DNA prive di geni.

Il 35% dei geni è costituito da geni unici

In *Arabidopsis* i geni contengono
in media 5 introni con
dimensione media di 160 bp



Le conoscenze ottenute con *Arabidopsis* sono utili anche per la comprensione della funzione di geni di altre specie



**Identità di sequenza tra
proteine di riso e *Arabidopsis***
(64 proteine di funzione nota scelte
a caso)

- ❖ Mutazioni del gene → effetto sul fenotipo
 - genetica forward (tradizionale)
 - genetica reverse (inversa)
- ❖ Aumento dell'espressione del gene
 - sovraespressione costitutiva ectopica
- ❖ Riduzione/silenziamento del gene
 - antisenso
 - RNAi

GENETICA TRADIZIONALE



Clonare un gene che è associato a un particolare fenotipo mutante o ad una particolare funzione

fenotipo mutante



gene

GENETICA INVERSA



Determinare la funzione di un gene, la cui sequenza è nota, generando un corrispondente mutante knockout ed analizzandone il fenotipo

gene

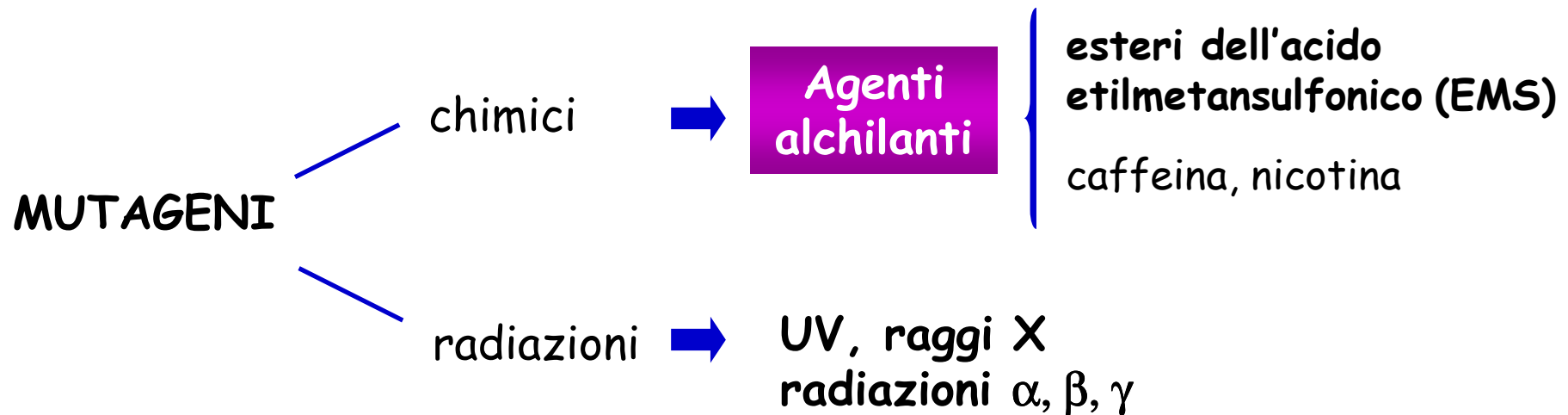


mutante knockout



fenotipo

MUTAGENESI può essere condotta direttamente sui semi.
Ogni seme contiene poche cellule che daranno luogo alla pianta matura.
Una mutazione indotta in una di queste cellule (seme M1) è replicata nella progenie (forma eterozigote in un settore della pianta matura);
i fiori formati da questo settore mutante, attraverso autofecondazione, produrranno semi M2, 1/4 dei quali saranno omozigoti.

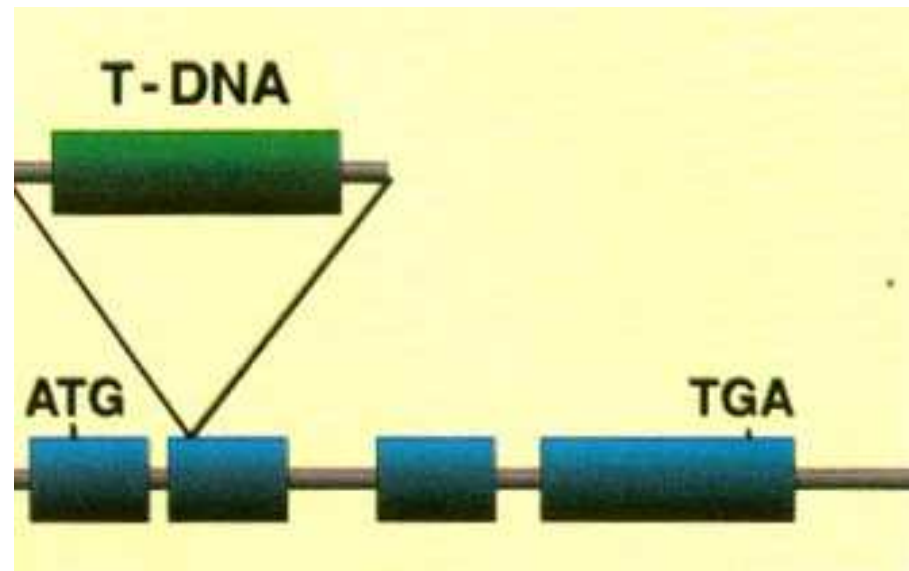


EMS alchila le G → la G alchilata si appaia con T invece che con C

MUTAGENESI PER INSERZIONE

→ TRASPOSONI

→ T-DNA



Negli ultimi 25 anni sono stati identificati diverse migliaia di mutanti di *Arabidopsis*

- Crescita e sviluppo della pianta
- Sviluppo del fiore
- Senescenza
- Germinazione
- Metabolismo
- Vie di trasduzione del segnale
- Risposte agli ormoni
- Risposte ai patogeni

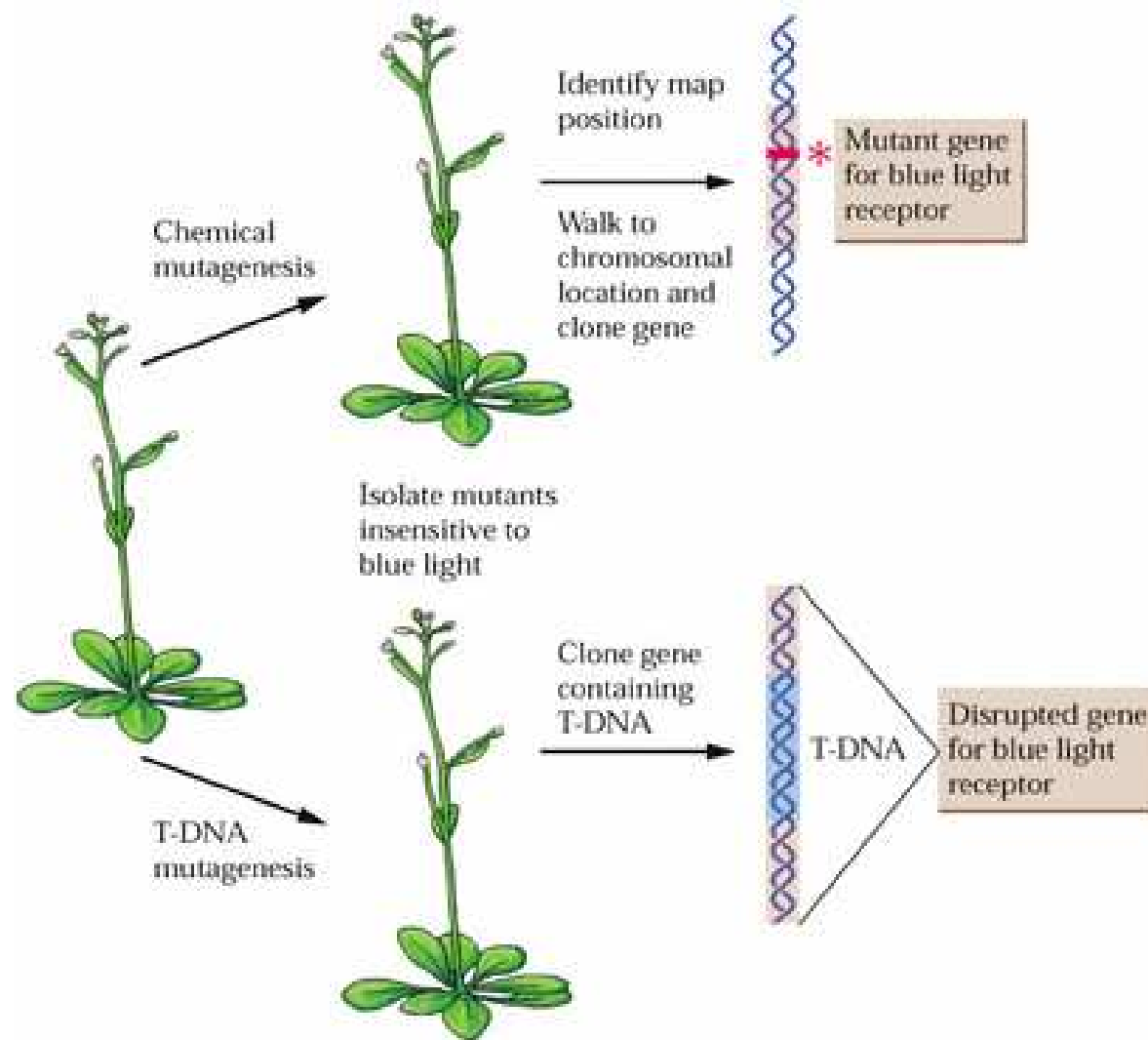
Se la mutazione è stata ottenuta per inserzione

il DNA inserito, oltre a creare la mutazione,
"etichetta" il gene di interesse
permettendone una più facile identificazione



gene tagging

confronto tra mutagenesi chimica e mutagenesi per inserzione



Transposon tagging

elementi trasponibili di mais funzionanti anche in Arabidopsis

Suppressor-mutator (Enhancer) - abbreviato Spm (o En)
Activator/Dissociation - abbreviato Ac/Ds

Il gene per la trasposasi e l'elemento non-autonomo sono introdotti separatamente.

L'incrocio tra linee omozigoti contenenti i due elementi dà inizio alla mutagenesi.

Per ottenere linee stabili, la progenie F1 viene autofecondata e si recupera la progenie F2 che ha ereditato l'elemento trasponibile, ma ha perso il gene per la trasposasi attraverso la segregazione

sia con il transposon tagging che con il T-DNA tagging è possibile selezionare le piante in cui è avvenuta l'inserzione se si usa un MARCATORE DI SELEZIONE (resistenza ad un antibiotico o ad un erbicida) associato all'elemento trasponibile o al T-DNA

Vantaggi del transposon tagging

- Il trasposone si integra come singola copia, mentre il T-DNA può avere un pattern di integrazione più complesso
- L'elemento trasposto può essere ri-mobilizzato dal sito di inserzione (reversione della mutazione); il T-DNA una volta integrato nel genoma è stabile

ANALISI DEL FENOTIPO

Come facciamo a essere sicuri che il fenotipo mutante osservato sia dovuto alla mutazione indotta?

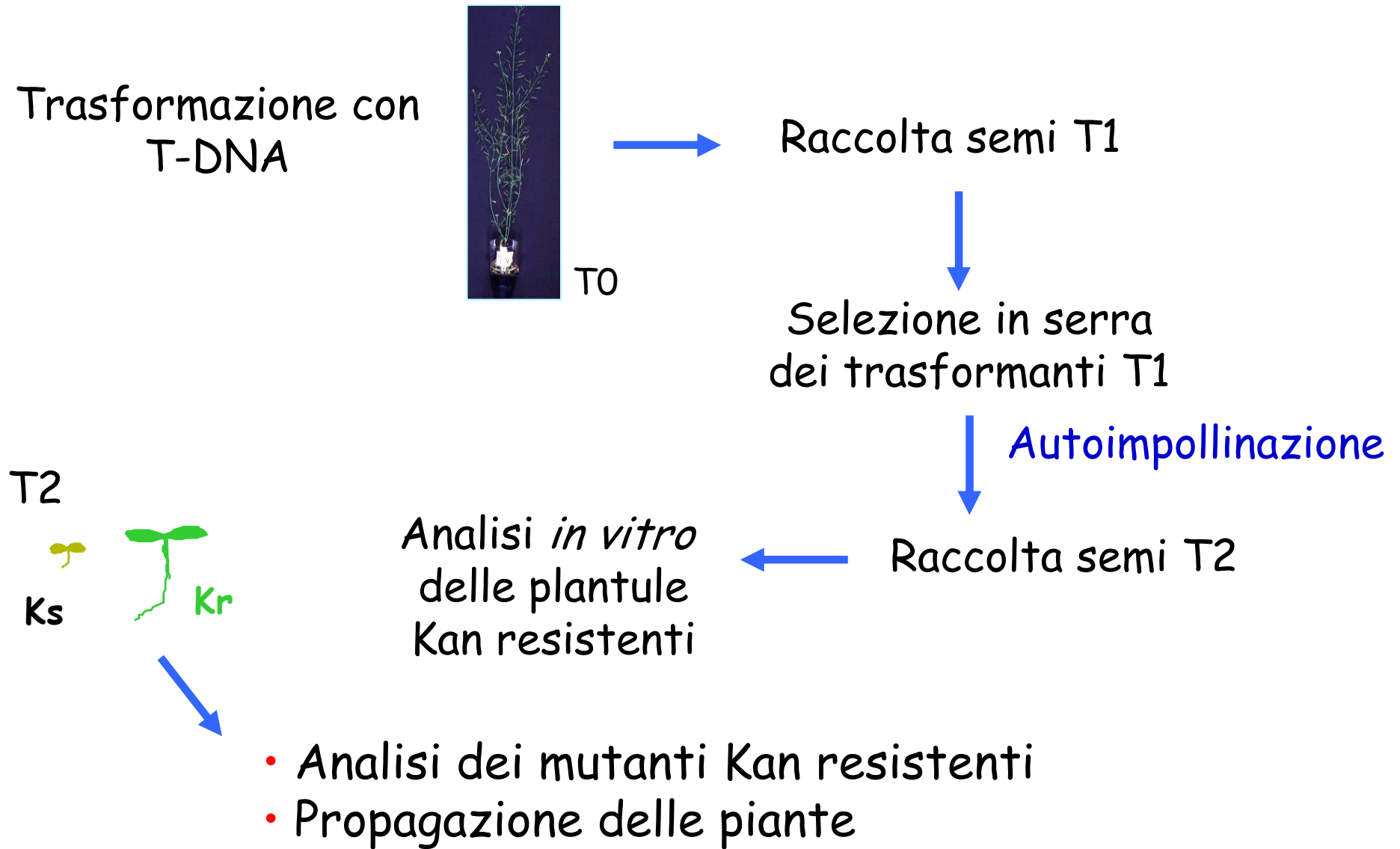
Uso di marcatori associati al T-DNA o al trasposone

- resistenza ad antibiotici
- resistenza ad erbicidi



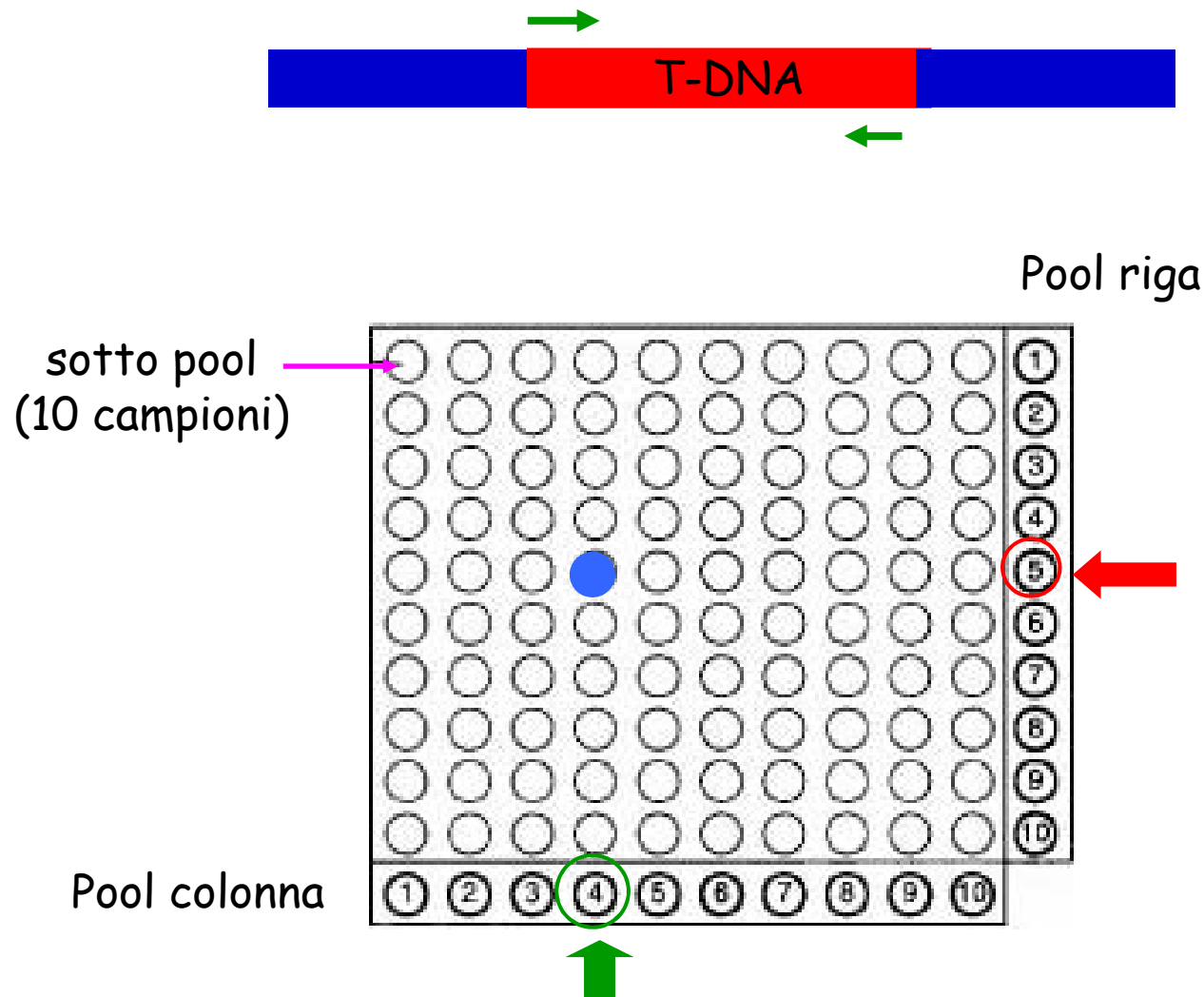
analisi di segregazione del fenotipo mutante e del marcatore

Strategia di isolamento di mutanti



Determinazione della presenza del T-DNA mediante PCR

(si rende necessaria quando la mutazione induce un fenotipo letale, isolamento del DNA da seme o embrione)



**COME SI IDENTIFICA UN GENE
MUTATO MEDIANTE INSERZIONE CON
T-DNA O TRASPOSONE?**

Identificare le sequenze fiancheggianti il DNA inserito

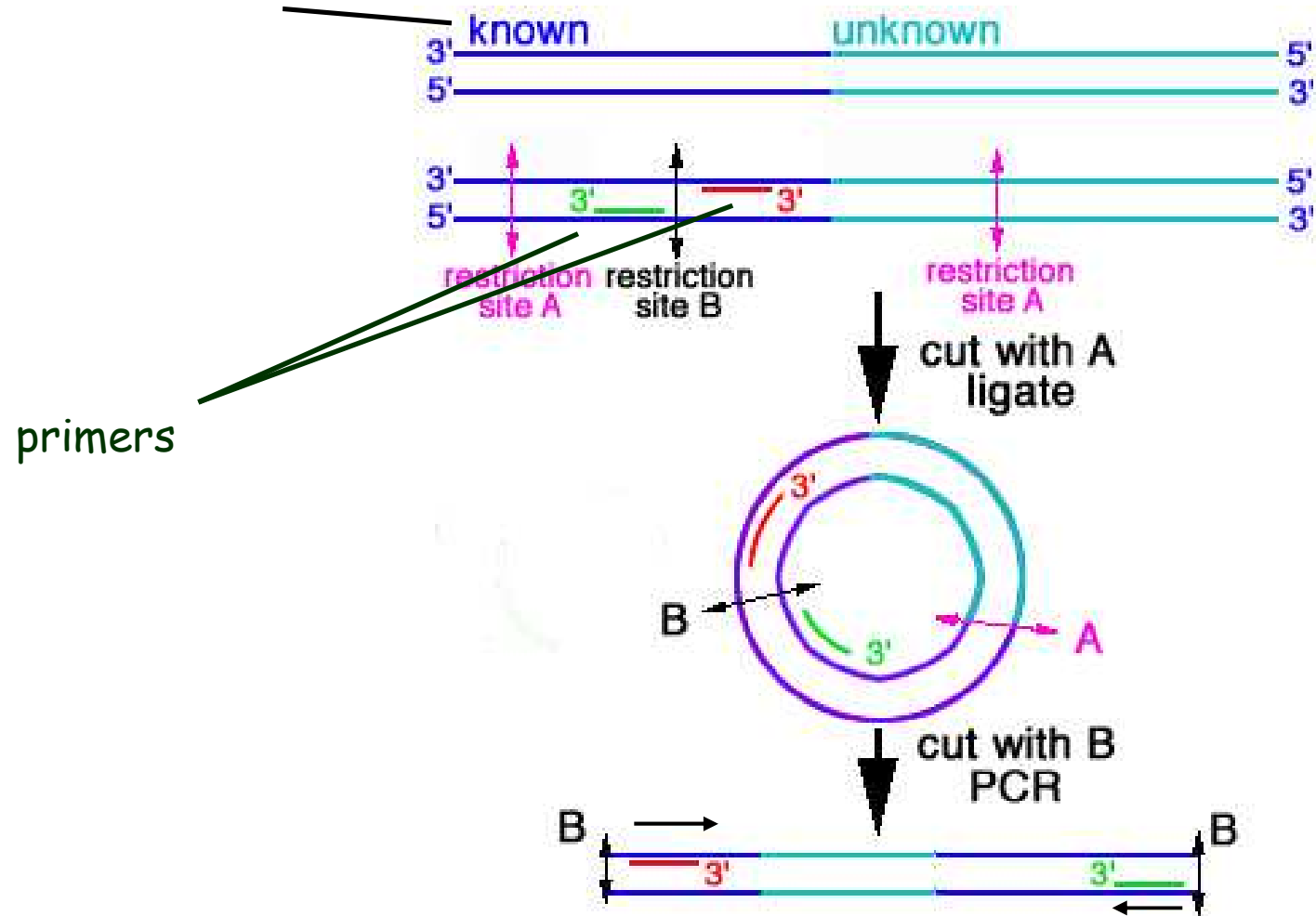


- analisi delle sequenze in banca dati
- eventuale omologia con geni noti

PCR inversa

Identificazione delle
sequenze fiancheggianti

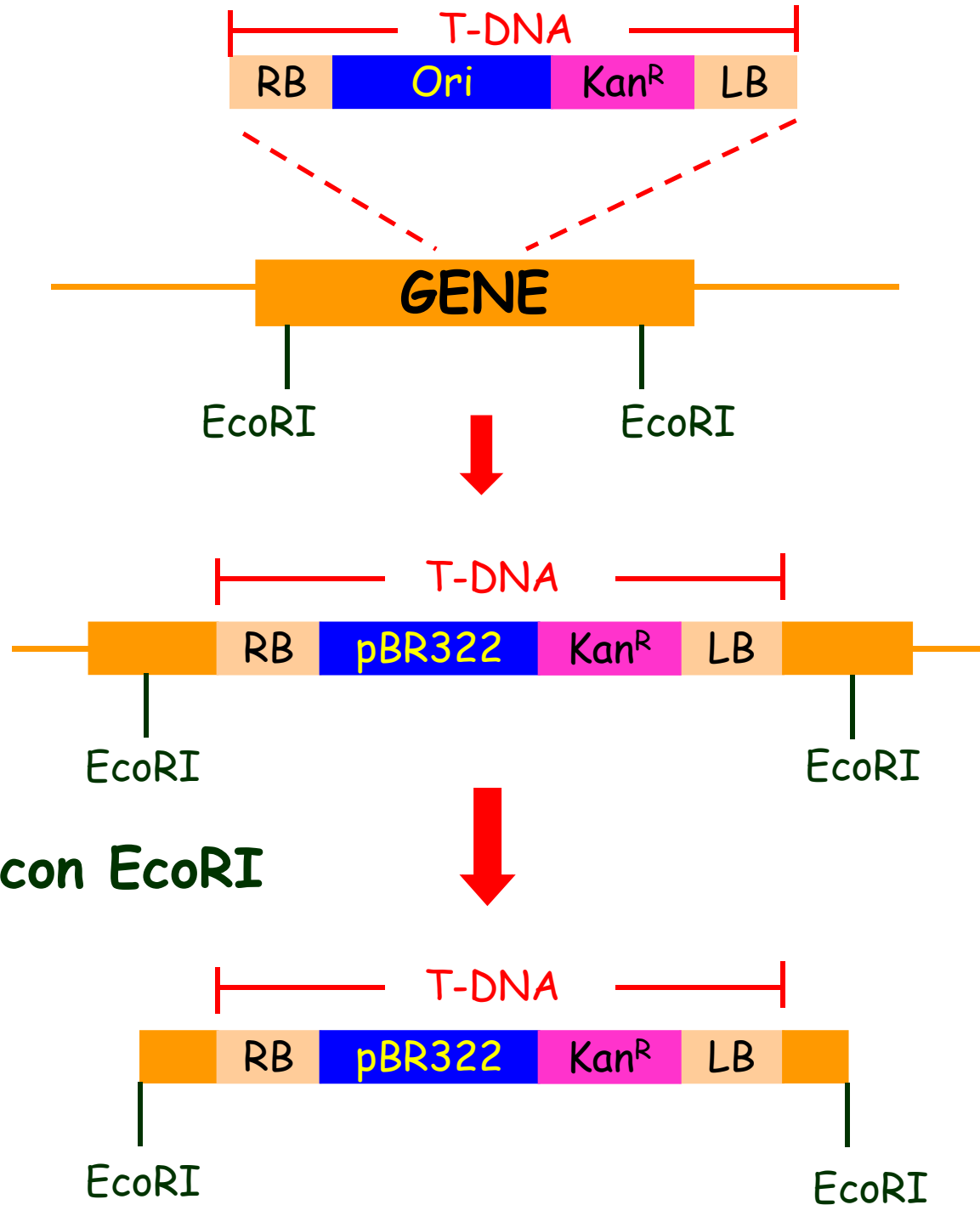
T-DNA o DS



genetica tradizionale

Identificazione
delle sequenze
fianceggianti

Recupero del
plasmide



Digestione con EcoRI

genetica tradizionale

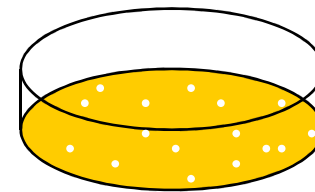
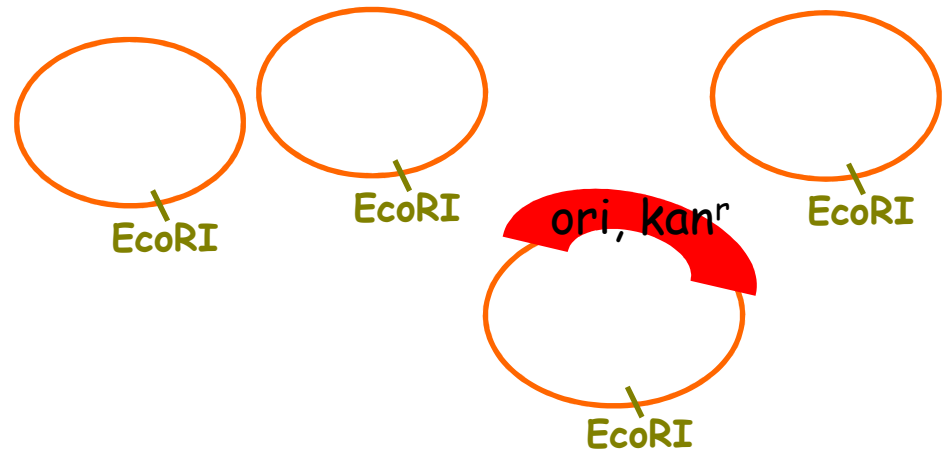
**Recupero del
plasmide**

Ligazione

Trasformazione E. coli

**Su terreno selettivo contenente
kanamicina cresceranno solo le
colonie che hanno acquisito il
plasmide**

**Da queste sarà possibile recuperare
il plasmide e sequenziarlo**



genetica tradizionale

Identificazione di un gene tramite COMPLEMENTAZIONE FUNZIONALE

Un gene vegetale ripristina il fenotipo wild type in un ceppo di lievito mutante

Isolamento del mutante di lievito che è carente del carattere di interesse



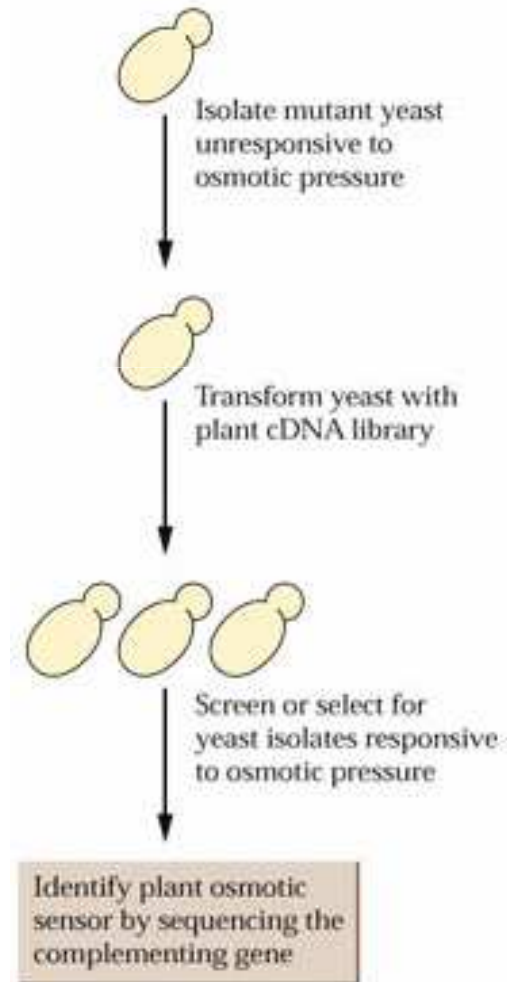
Trasformazione con una libreria di cDNA di pianta



Identificazione delle colonie che complementano



Sequenziamento del cDNA di interesse



genetica inversa

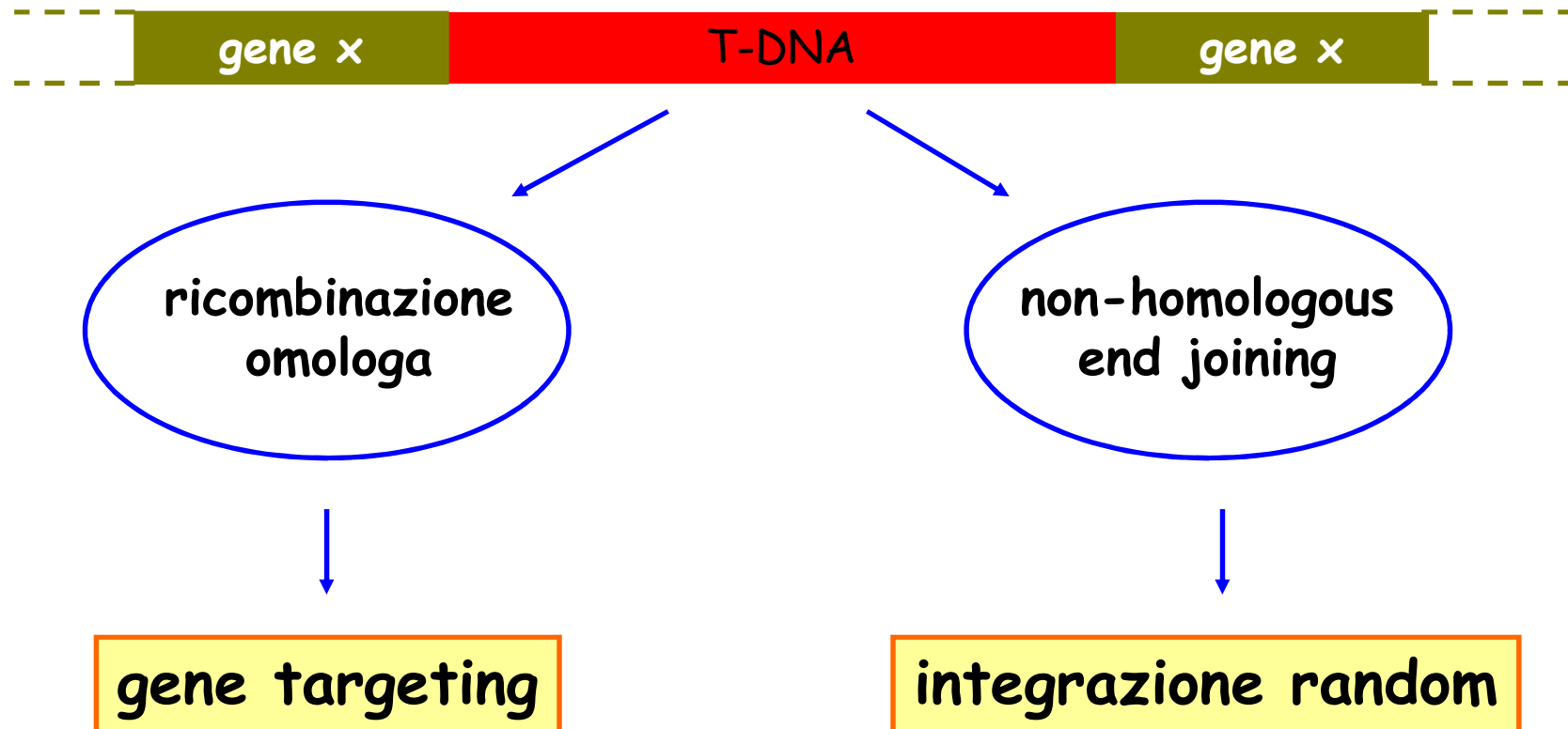
SEQUENZA DEL GENE NOTA

NON NOTA LA FUNZIONE



mutare uno specifico gene e vedere l'effetto
della mutazione allo scopo di capire la
funzione del gene

genetica inversa

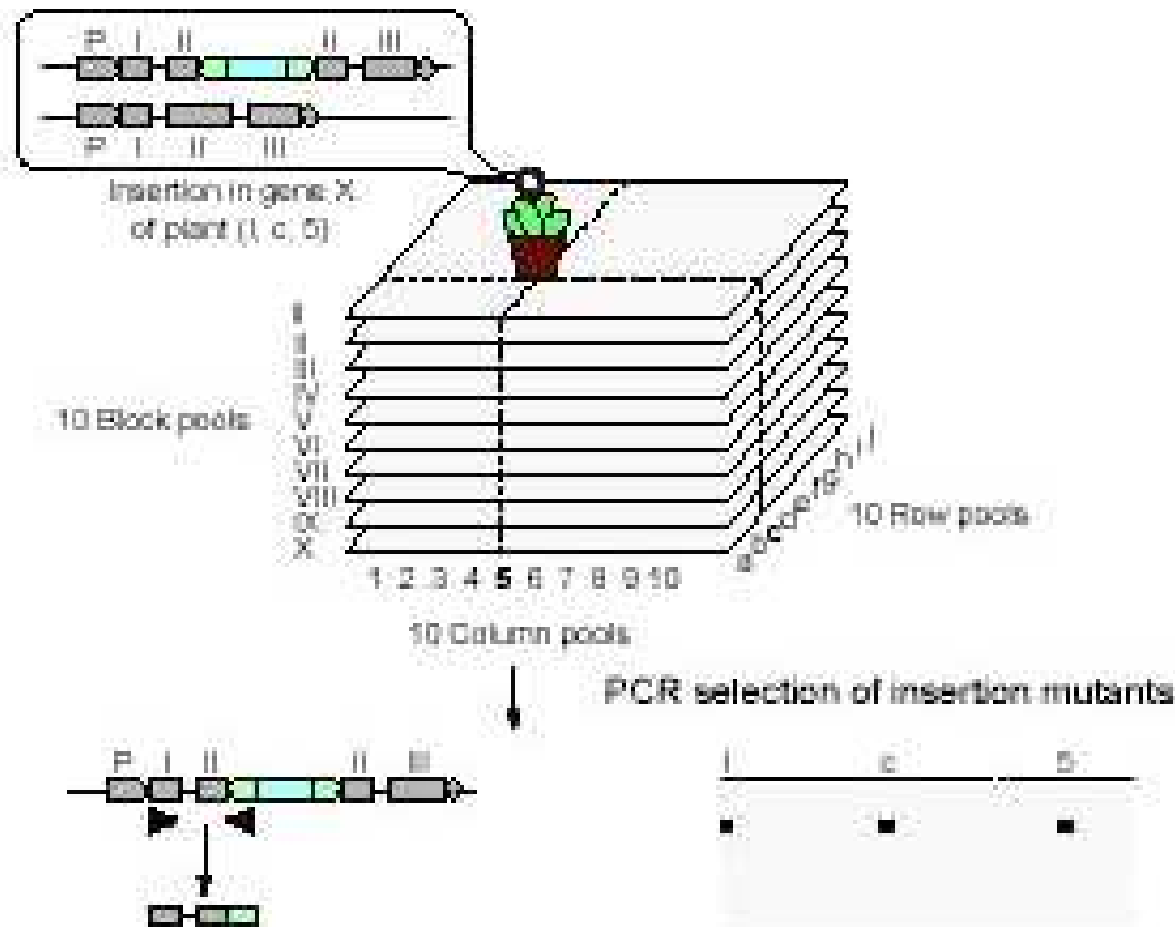


Nelle piante è molto difficile il gene targeting
perché non avviene ricombinazione omologa

quindi:

- **mutazione dei semi**
- **ricerca del mutante con lo specifico gene mutato**

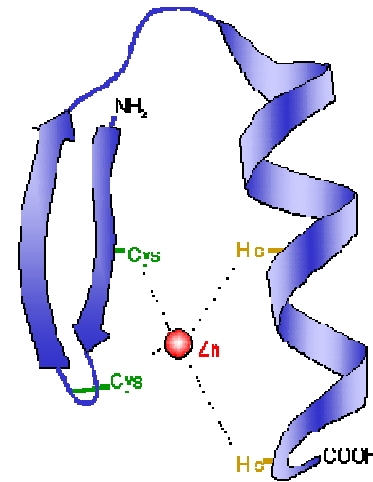
Identificazione di un mutante di inserzione in un determinato gene X la cui sequenza è nota



GENE-TARGETING

uso delle **NUCLEASI ZINC FINGER**

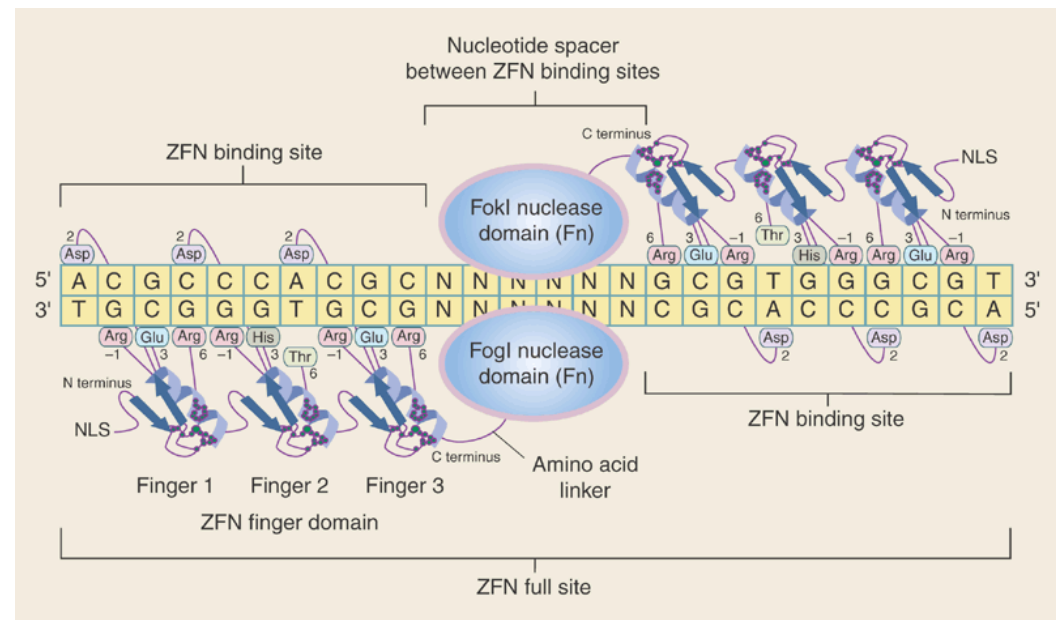
ZINC FINGER: domini di legame al DNA



ZINC FINGER NUCLEASE (ZNF)

moduli di zinc finger legati
al dominio nucleasico di FokI

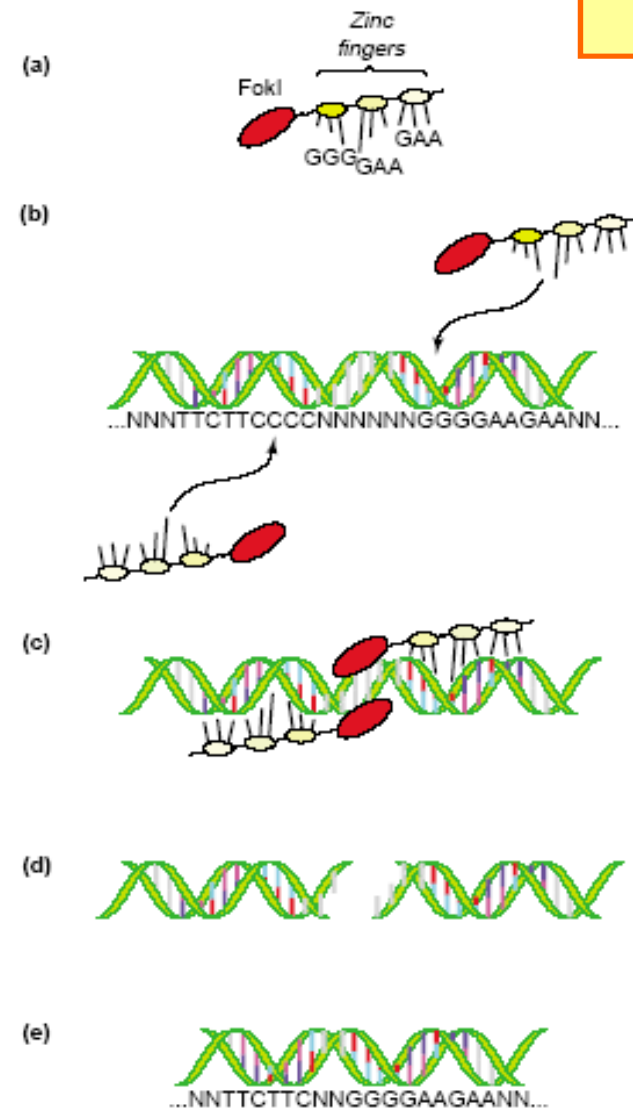
legame estremamente specifico



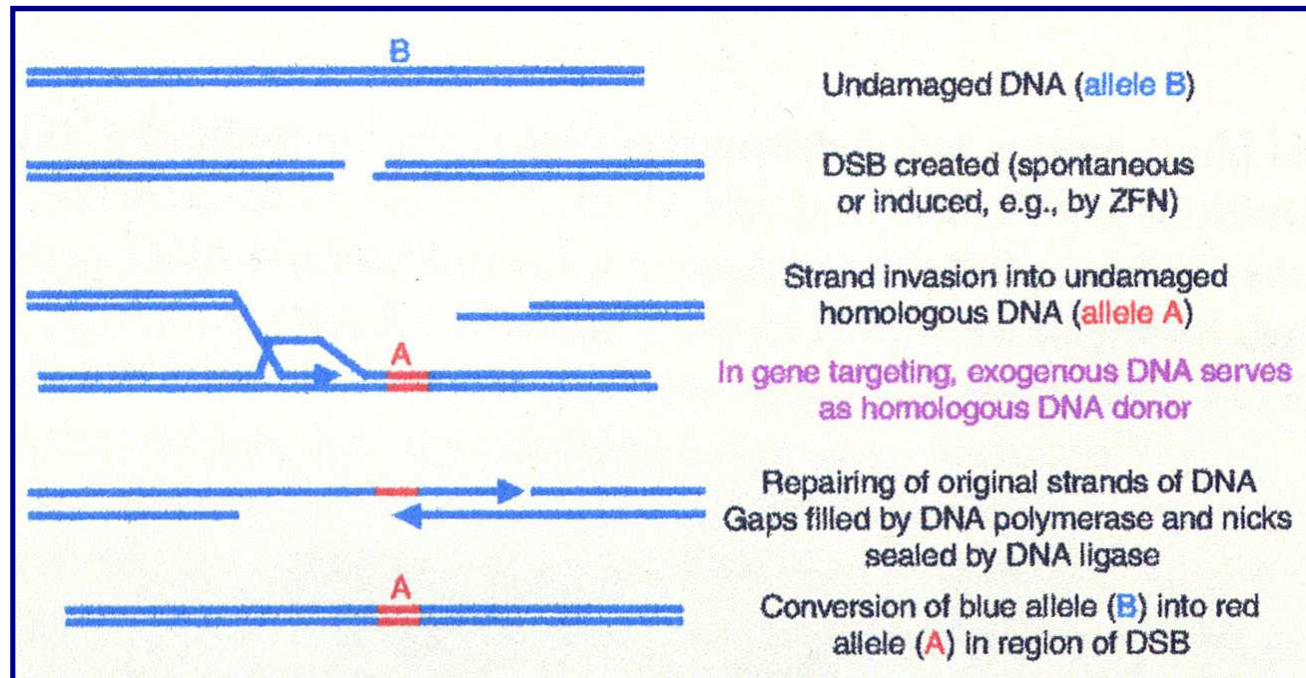
gene-targeting ZNF

si possono "disegnare" ZFN
capaci di riconoscere una
specifica sequenza genica

la nucleasi induce la formazione
di un Double strand break (DBS)



gene-targeting
ZNF



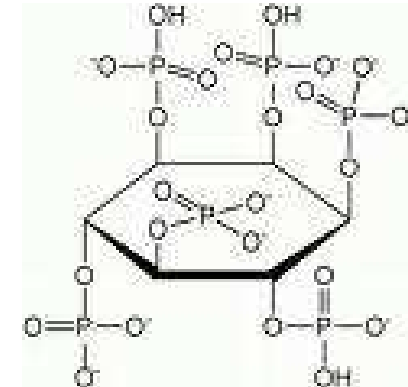
normalmente i DSB
vengono riparati
usando il cromatide
fratello come stampo

se è presente un DNA "donatore"
esogeno, può essere usato questo come
stampo per la riparazione del DNA

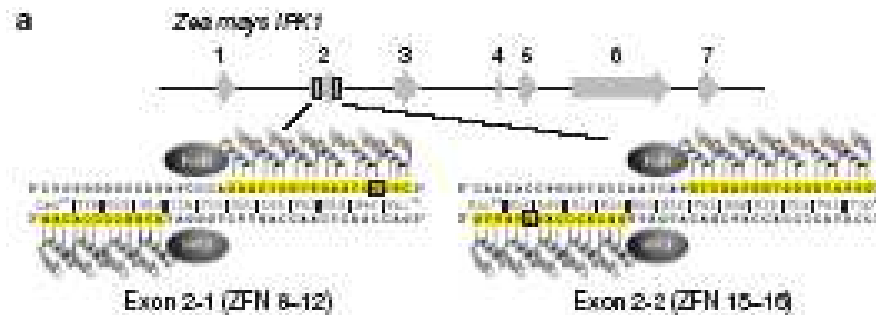
esempio: knock out del gene *IPK1* (inositolo fosfato chinasi) di mais

gene-targeting
ZNF

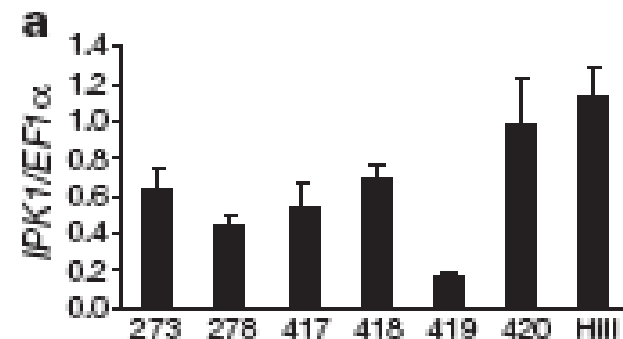
enzima coinvolto nella sintesi di inositolo esafosfato
l'inositolo esafosfato (acido fitico) è un anti-nutriente
nelle piante è utilizzato per accumulare fosfato



**OTTENERE UNA PIANTA DI MAIS CON
RIDOTTI LIVELLI DI ACIDO FITICO**



riduzione dei livelli di trascritto di *IPK1*



Mutazioni

LOSS OF FUNCTION

Il fenotipo deriva dalla perdita
dell'espressione del gene
RECESSIVE

GAIN OF FUNCTION

Permettono di acquisire una
nuova funzione assente nel
fenotipo wild type
DOMINANTI

IDENTIFICAZIONE DELLA VIA DI TRASDUZIONE DELL'ETILENE

Risposta tripla

Ridotto allungamento del fusto (e della radice)

Aumento dell'accrescimento laterale (rigonfiamento)

Accrescimento orizzontale anormale

In Arabidopsis: curvatura accentuata del gancio apicale

Selezione dei mutanti analizzando il
fenotipo in presenza o in assenza
dell'ormone

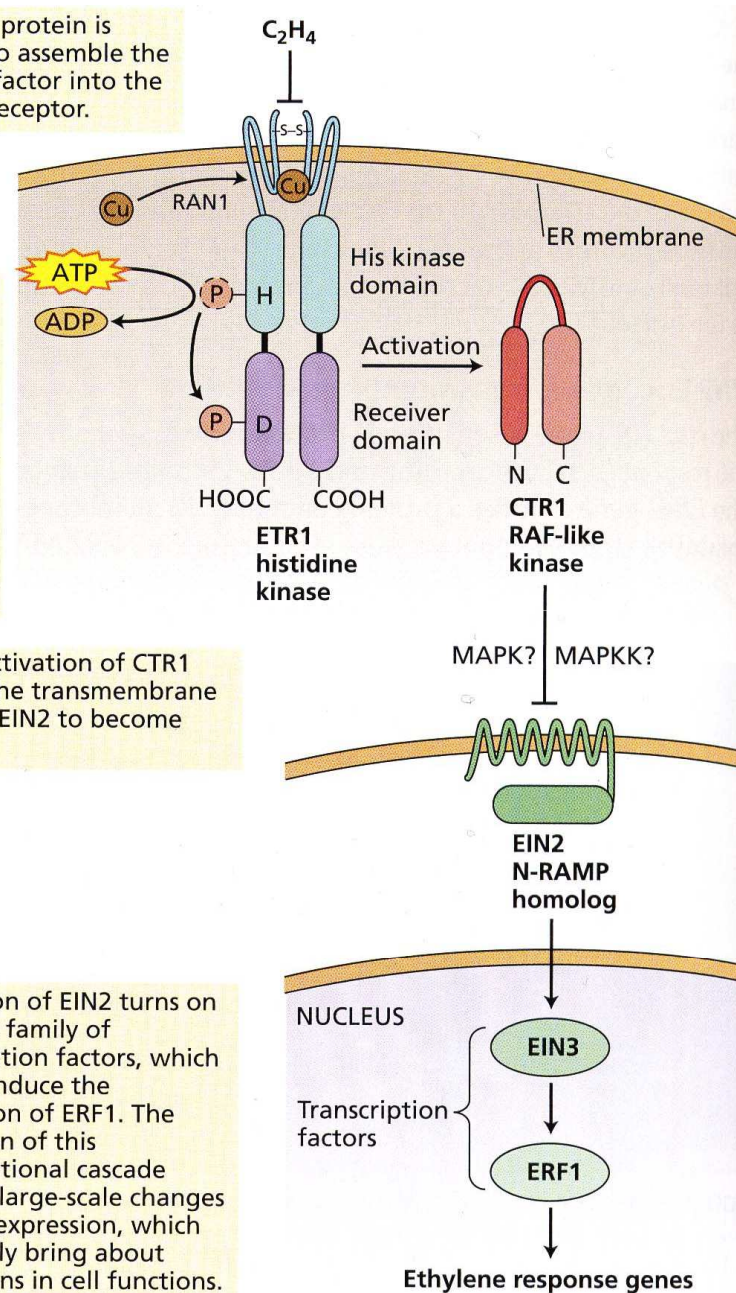
Trasduzione del segnale indotto dall'etilene

The RAN1 protein is required to assemble the copper cofactor into the ethylene receptor.

In the absence of ethylene, ETR1 and the other ethylene receptors activate the kinase activity of CTR1. This leads to a repression of the ethylene response pathway, possibly through a MAP kinase cascade. The binding of ethylene to the ETR1 dimer results in its inactivation, which causes CTR1 to become inactive.

The inactivation of CTR1 allows the transmembrane protein EIN2 to become active.

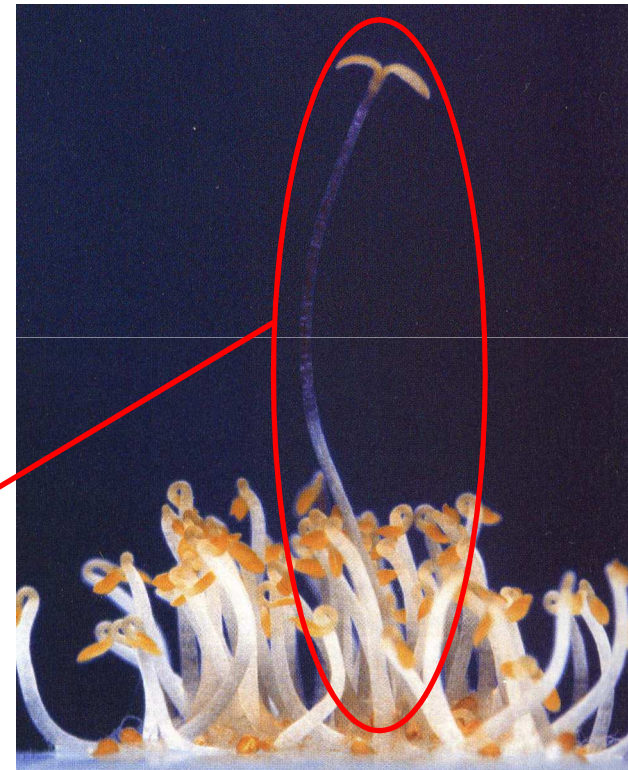
Activation of EIN2 turns on the EIN3 family of transcription factors, which in turn induce the expression of ERF1. The activation of this transcriptional cascade leads to large-scale changes in gene expression, which ultimately bring about alterations in cell functions.



Mutante *etr1* (ethylene-resistant 1) insensibile all'etilene

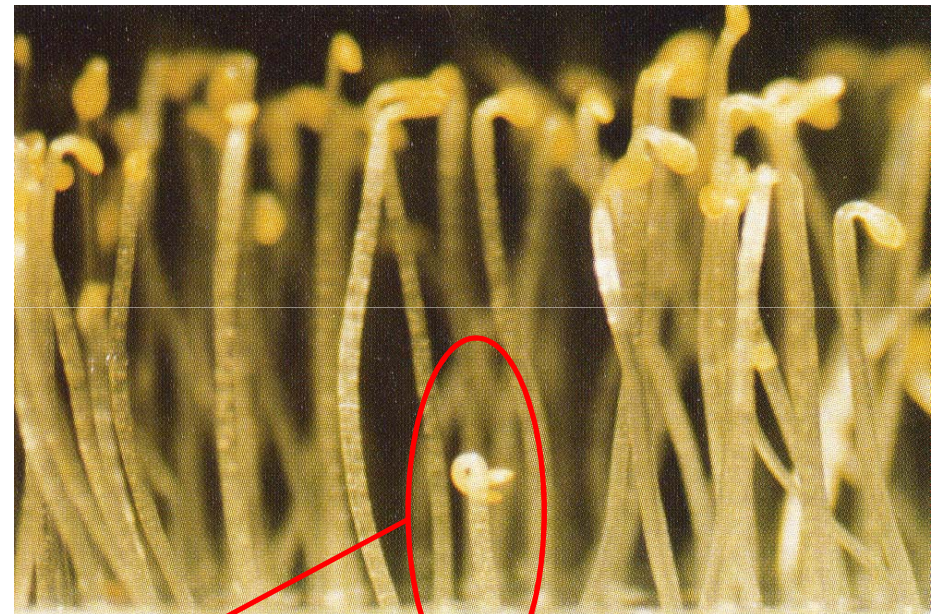
Dopo aver mutagenizzato (EMS)
le piantine di *Arabidopsis* erano
cresciute 3 giorni al buio in
presenza di etilene

Il mutante non mostra risposta
tripla in presenza di etilene



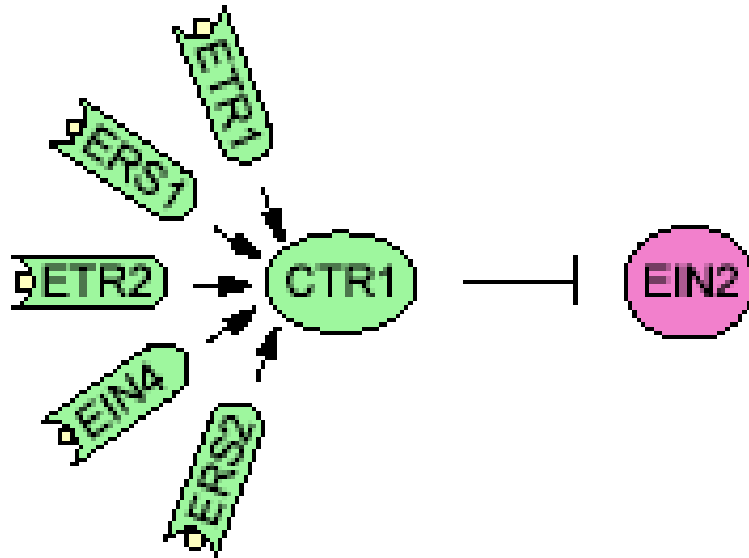
Mutante *ctr1* (constitutive triple response 1)

Dopo aver mutagenizzato (EMS) le
piantine di *Arabidopsis* erano
cresciute 3 giorni al buio in
presenza di aria



Il mutante mostra risposta tripla
anche in assenza di etilene

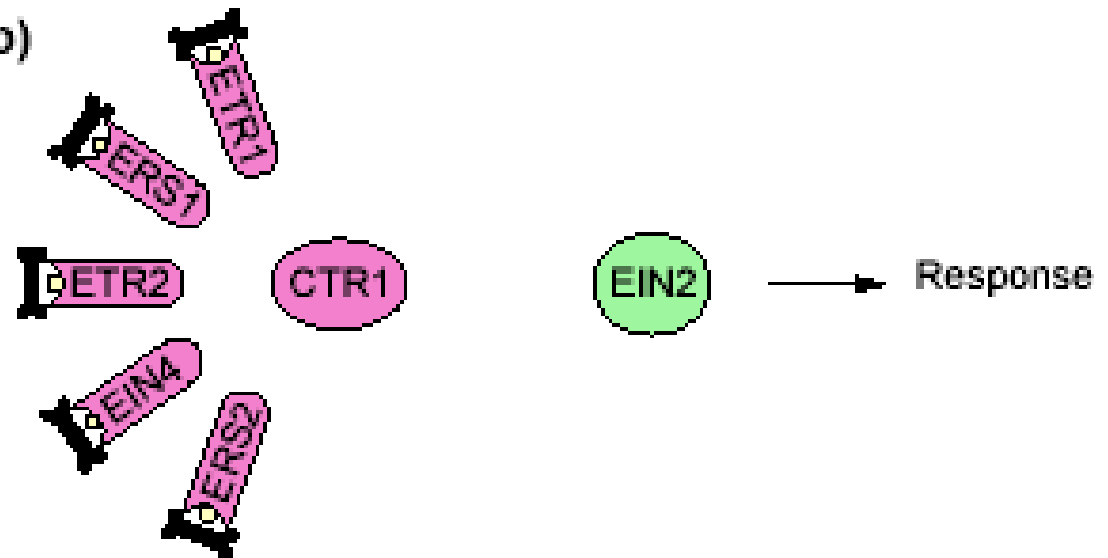
(a)

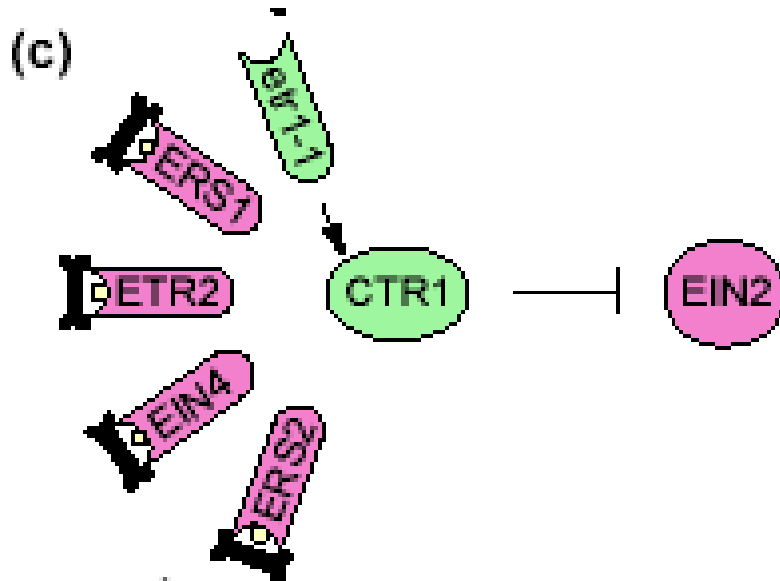


In **assenza di etilene** il recettore
è attivo su CTR1,
CTR1 attivato inibisce EIN2
NON SI HA RISPOSTA TRIPLA

In **presenza di etilene** il
recettore viene inibito,
CTR1 non è attivato e
non inibisce EIN2
RISPOSTA TRIPLA

(b)



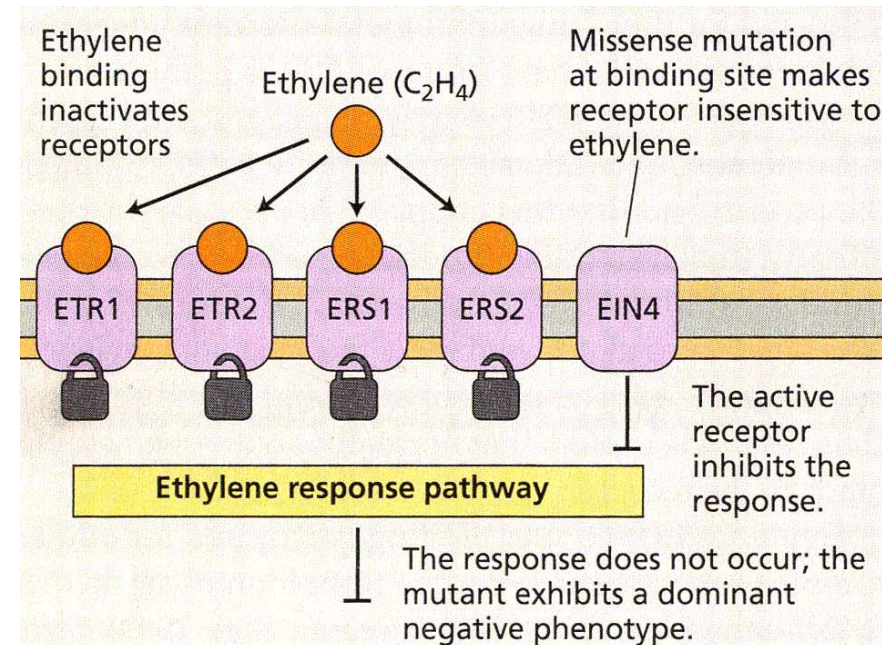


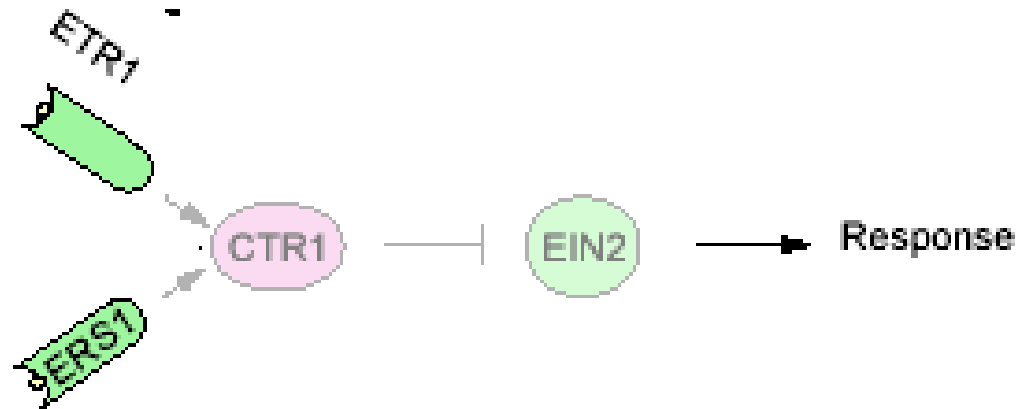
Mutante *etr1*

ETR1 mutato è insensibile all'etilene e attiva CTR1 anche in sua presenza

NON SI HA RISPOSTA TRIPLA ANCHE IN PRESENZA DI C_2H_4

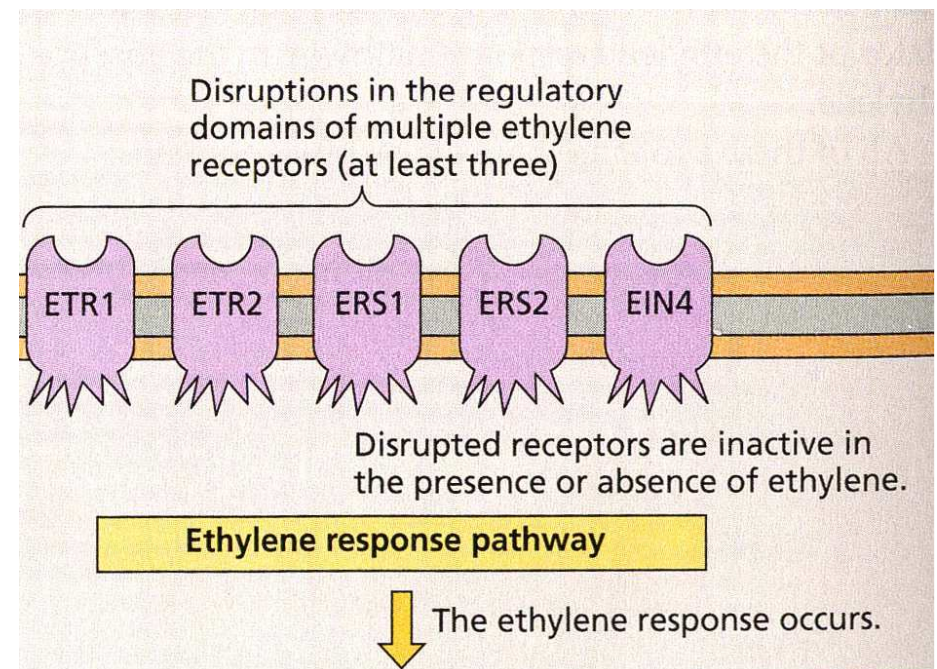
mutazione gain of function





Fenotipo a risposta costitutiva

La mutazione loss of function dei recettori dell'etilene produce una risposta costitutiva in presenza e in assenza di etilene, infatti CTR1 è sempre in uno stato inattivo



ANALISI EPISTATICA

Permette di determinare la posizione di un componente rispetto ad un altro in una via di trasduzione di un segnale cellulare

Una mutazione si definisce epistatica se può mascherare il fenotipo indotto da un'altra mutazione sostituendolo con il proprio

Le 2 mutazioni devono avere fenotipi chiaramente distinti

- insensibilità ad un ormone
- risposta costitutiva in assenza dell'ormone

Se le mutazioni conferiscono segnali opposti la mutazione epistatica sarà geneticamente "downstream"

Il mutante *ctr1* è epistatico rispetto al mutante *etr1*, infatti il doppio mutante *etr1/ctr1* presenta il fenotipo costitutivo di *ctr1*

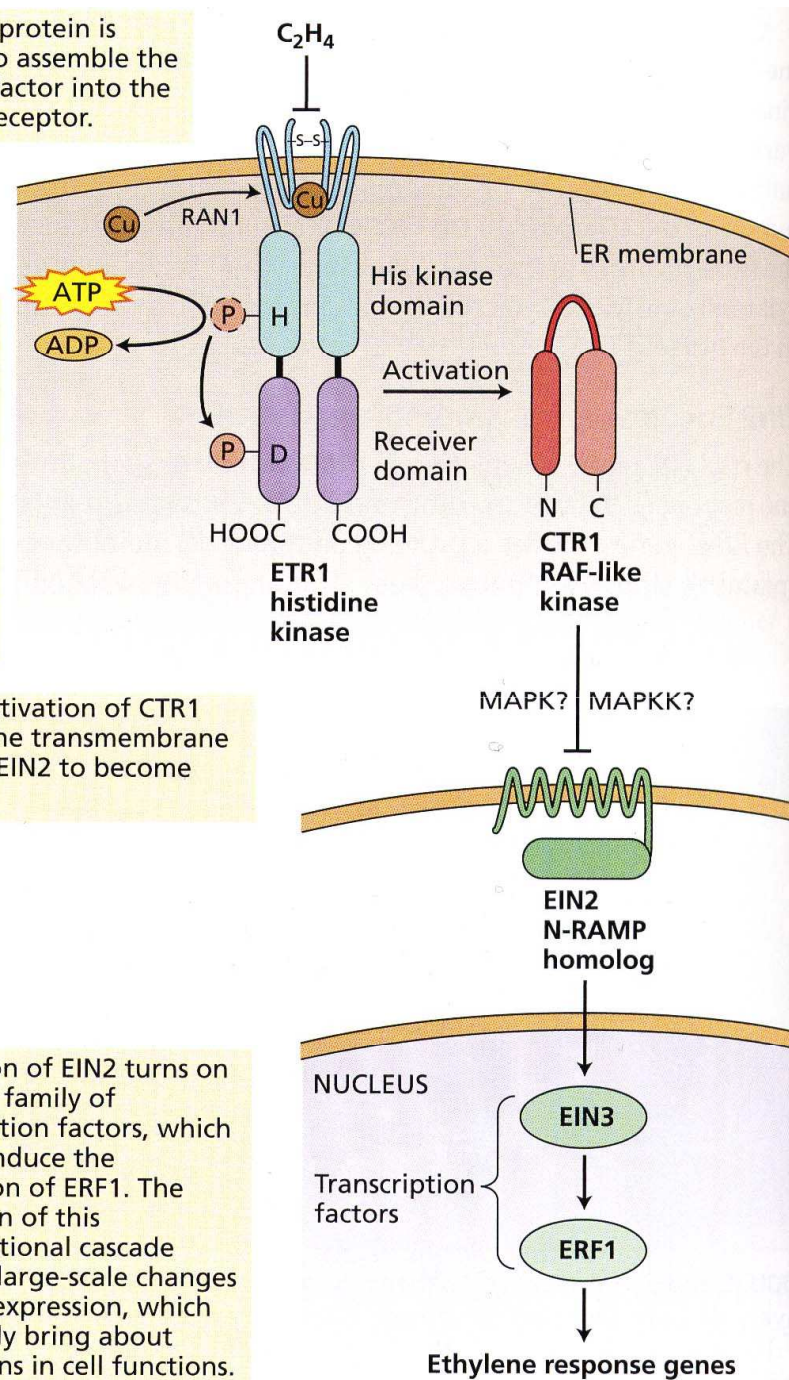
CTR1 si trova a valle di ETR1

The RAN1 protein is required to assemble the copper cofactor into the ethylene receptor.

In the absence of ethylene, ETR1 and the other ethylene receptors activate the kinase activity of CTR1. This leads to a repression of the ethylene response pathway, possibly through a MAP kinase cascade. The binding of ethylene to the ETR1 dimer results in its inactivation, which causes CTR1 to become inactive.

The inactivation of CTR1 allows the transmembrane protein EIN2 to become active.

Activation of EIN2 turns on the EIN3 family of transcription factors, which in turn induce the expression of ERF1. The activation of this transcriptional cascade leads to large-scale changes in gene expression, which ultimately bring about alterations in cell functions.



**Per capire la funzione di un gene
può essere utile studiare come varia
la sua espressione**

DIFFERENTIAL DISPLAY



→ mRNA → Trascrizione inversa

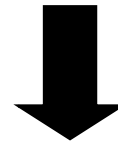


→ mRNA → Trascrizione inversa

DIFFERENTIAL DISPLAY

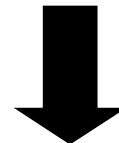
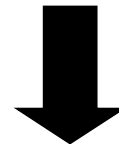


Trascrizione inversa



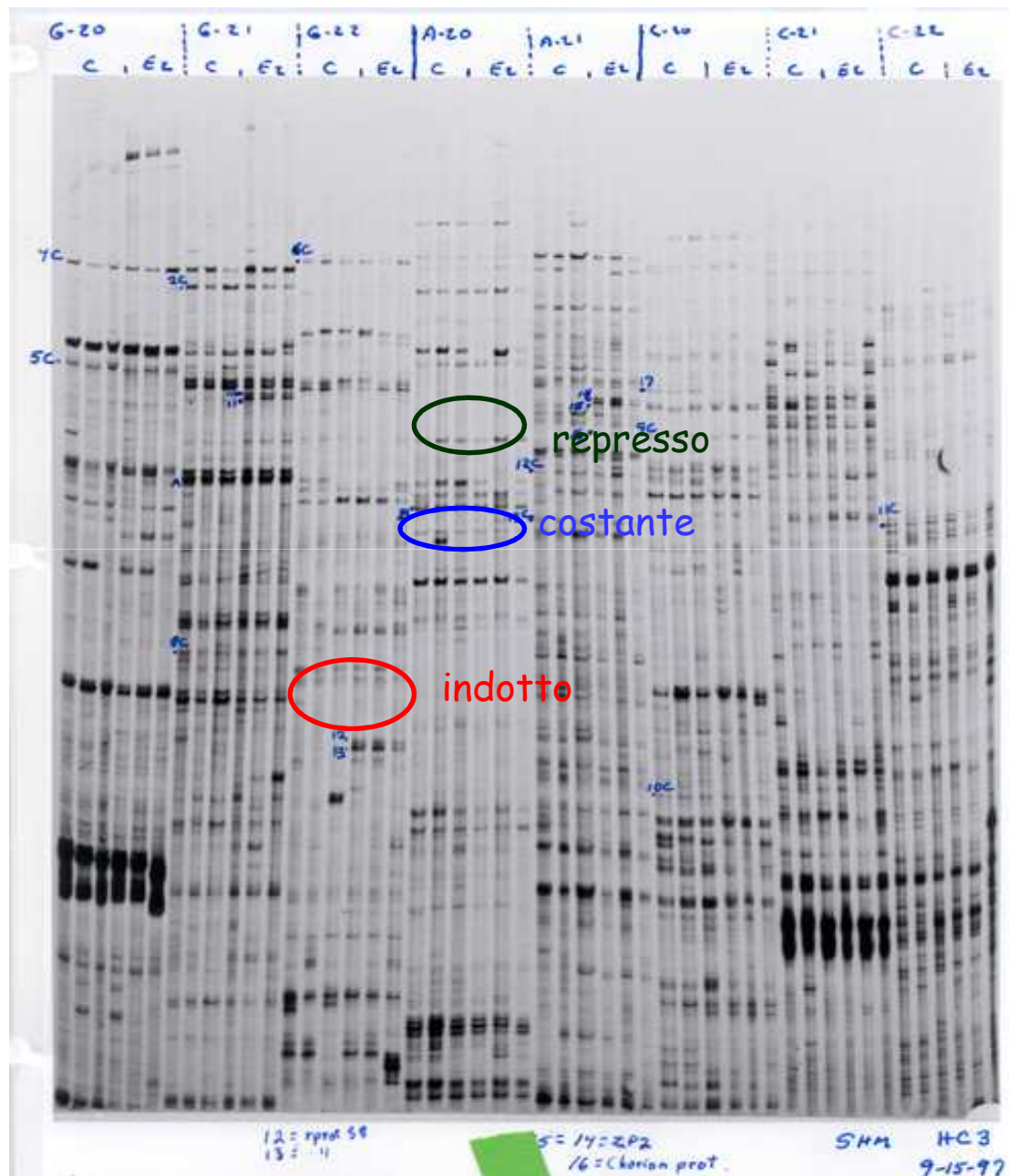
random primers
(miscela)

PCR

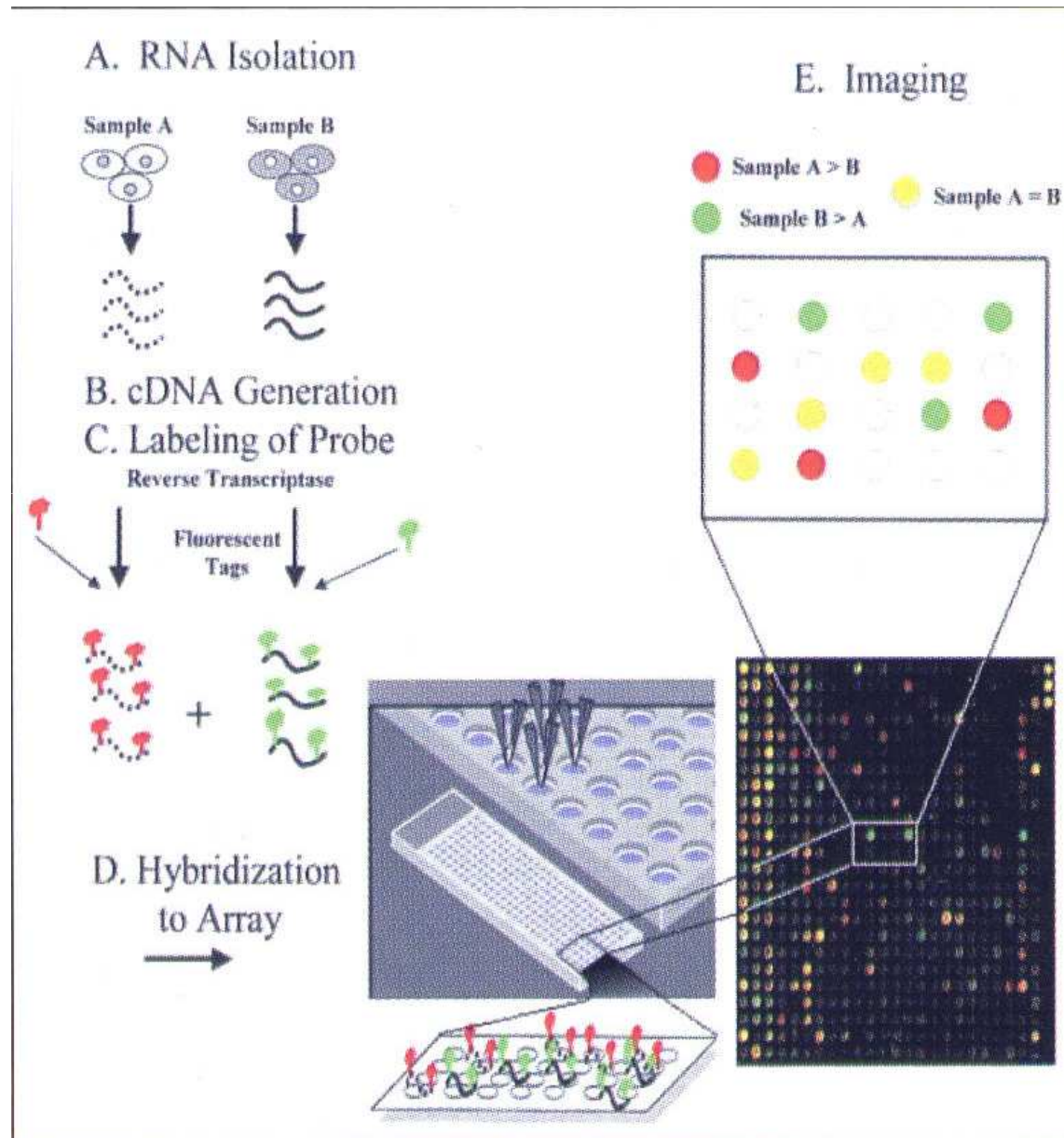


separazione dei frammenti in elettroforesi

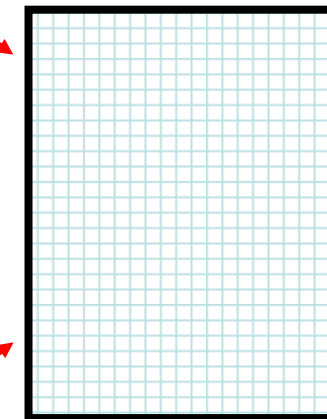
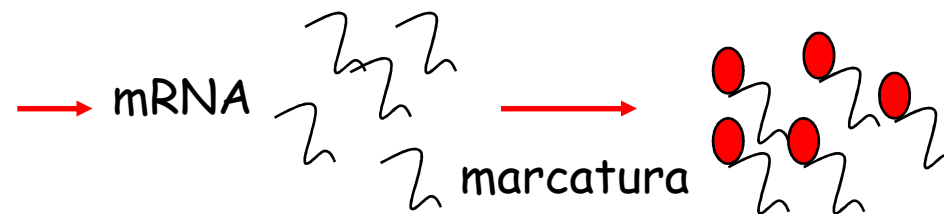
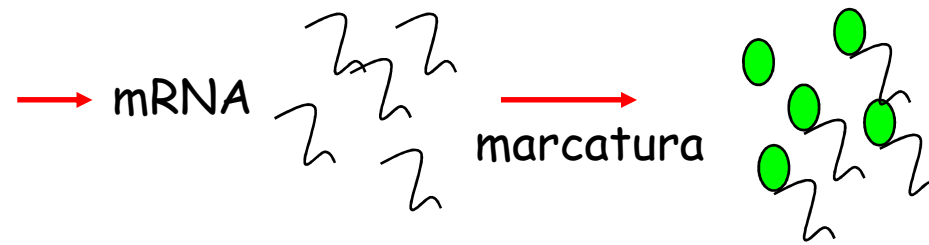
DIFFERENTIAL DISPLAY



DNA Microarray



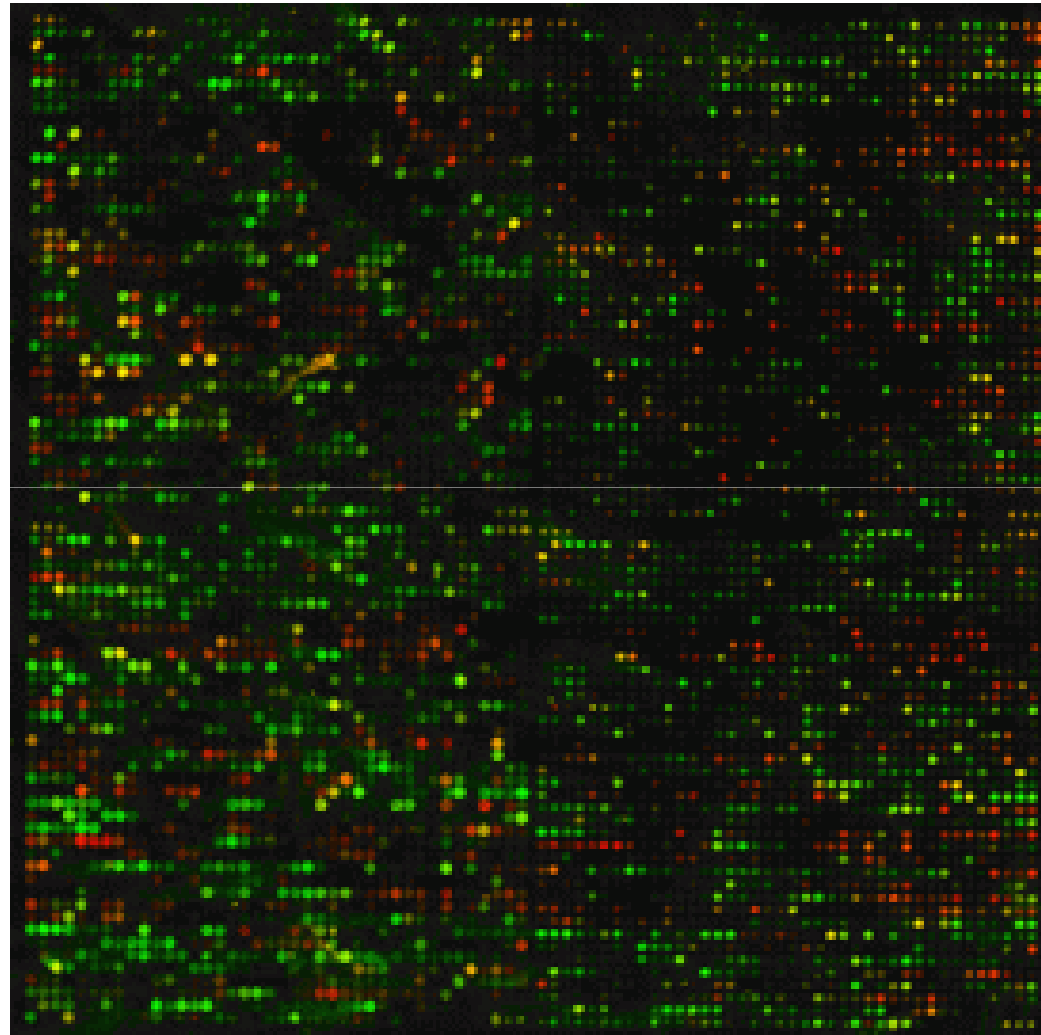
DNA Microarray



CHIP con
cDNA
immobilizzato

maggiore è il numero dei
geni immobilizzati sul chip
migliore è il risultato

DNA Microarray



Come si studia la funzione
di un gene?

- ❖ Mutazioni del gene → effetto sul fenotipo
 - genetica forward (tradizionale)
 - genetica reverse (inversa)

- ❖ Aumento dell'espressione del gene
 - sovraespressione costitutiva
ectopica

- ❖ Riduzione/silenziamento del gene
 - antisenso
 - RNAi

Come si studia la funzione
di un gene?

**Favorire la comprensione e lo
studio del ruolo fisiologico di
molti geni**



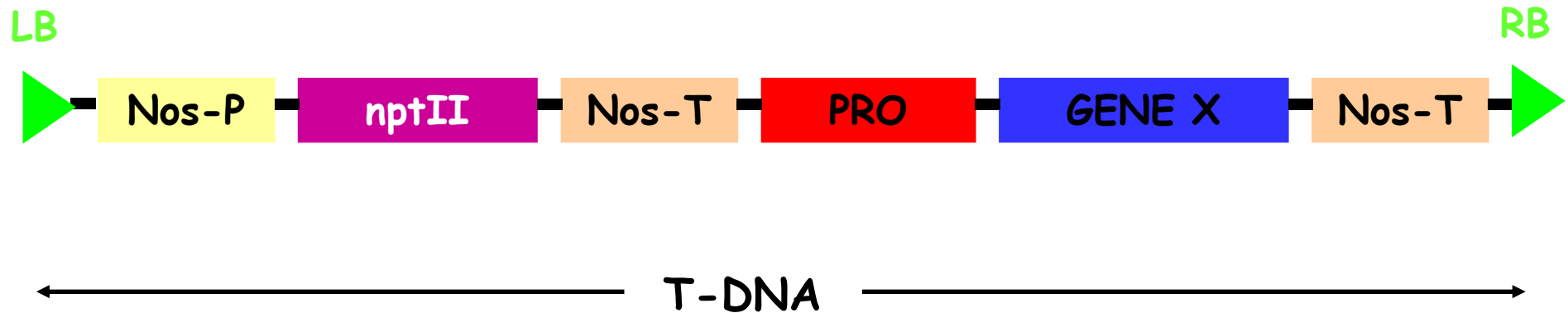
**Studio degli effetti sul
fenotipo correlati alla
sovraespressione del gene
di interesse**

Sovraespressione di un gene di interesse

- **PREPARAZIONE DEL COSTRUTTO**
- **TRASFORMAZIONE DELLA PIANTA**
- **ANALISI DEL FENOTIPO**
- **SAGGI BIOCHIMICO-FUNZIONALI**

Sovraespressione
gene

PREPARAZIONE DEL COSTRUTTO



Quale promotore utilizzare per la
sovraespressione del gene X?

PROMOTORI

COSTITUTIVI

CaMV RNA 35S

Actina

Ubiquitina

TESSUTO-SPECIFICI

α -amilasi (aleurone)

glutelina (endosperma)

PEPcarbossilasi (tessuto verde)

INDUCIBILI

luce

heat shock

sostanze chimiche

Promotori inducibili

VANTAGGI

- E' possibile analizzare la funzione di geni la cui espressione ectopica è tossica
- La funzione del transgene può essere analizzata comparando la stessa pianta in condizioni di induzione e di non induzione
- Poichè l'attivazione del transgene ha "un inizio", è possibile capire meglio gli eventi causati dalle sue funzioni

PROMOTORI INDUCIBILI CHIMICAMENTE

Table 1

Desired properties of an ideal chemical-inducible system in plants.

Very low basal expression level

High inducibility

High specificity with respect to inducers

High dynamic range of response with respect to inducer concentrations

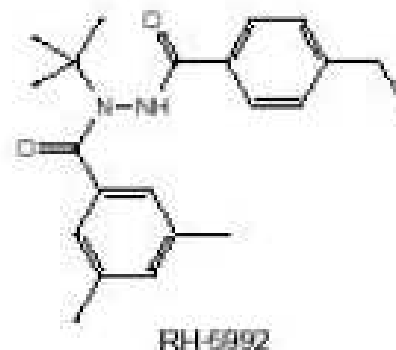
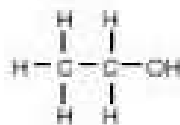
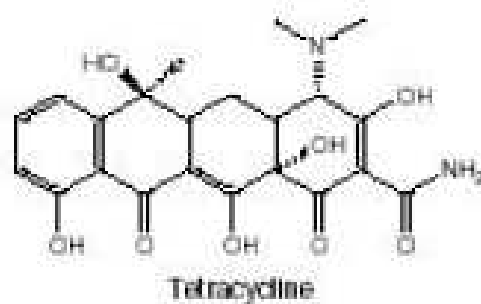
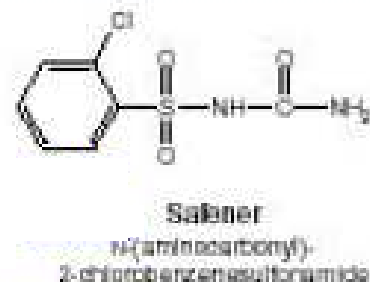
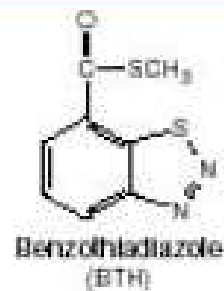
Fast response upon induction

Rapid switch-off following inducer withdrawal

Inducer not toxic and has no physiologic effects plants

Inducer not found in target plants

molecole utilizzate per l'induzione chimica dell'espressione di transgeni in pianta



SISTEMA DI ESPRESSIONE INDUCIBILE DA TETRACICLINA

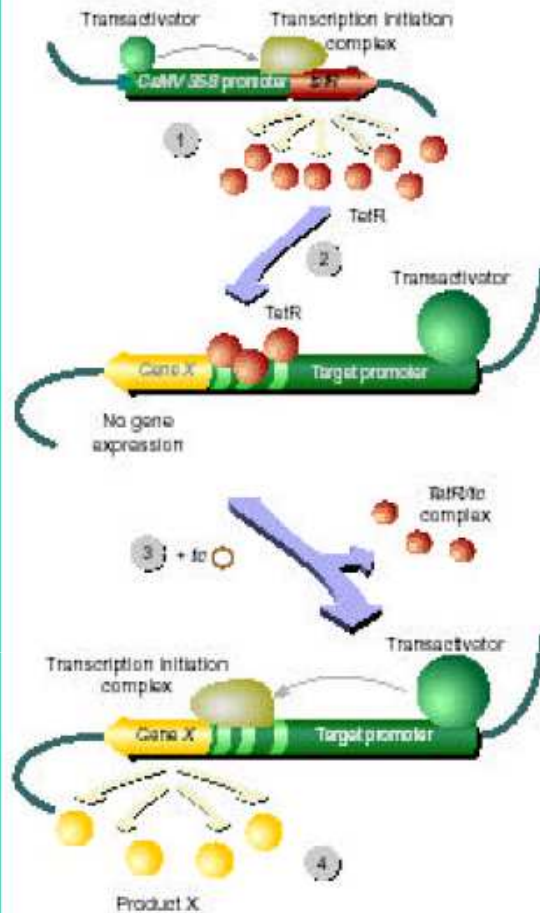


Fig. 2. The tetracycline-inducible expression system. (1) The *Tn10* encoded Tet repressor (TetR, M_r 24 kDa) is synthesized under the control of a strong constitutive promoter (e.g. CaMV 35S promoter). (2) The target promoter (e.g. a modified CaMV 35S promoter) contains three 19 bp tet operator sites that flank the TATA box. By binding to these sequences, three TetR dimers interfere with the assembly of the transcription initiation complex. As the transcription initiation complex is stabilized by multiple protein-protein interactions, stringent repression requires high levels of TetR. (3) The antibiotic binds to TetR with a high affinity, abolishing its DNA-binding ability. (4) Under these conditions, repression is relieved, leading to the synthesis of the gene product. This system has been shown to work in tobacco, potato and tomato plants, but not in *Arabidopsis*, which might not tolerate the amounts of TetR needed for efficient repression.

- livelli di espressione paragonabili a quelli ottenuti con il CaMV 35S
- la Tet può essere facilmente applicata per infiltrazione (anche solo sul tessuto dove si vuole studiare l'espressione del transgene)
- funziona in tabacco, pomodoro, patata, ma non in *Arabidopsis*

PROMOTORI INDUCIBILI DA STEROIDI

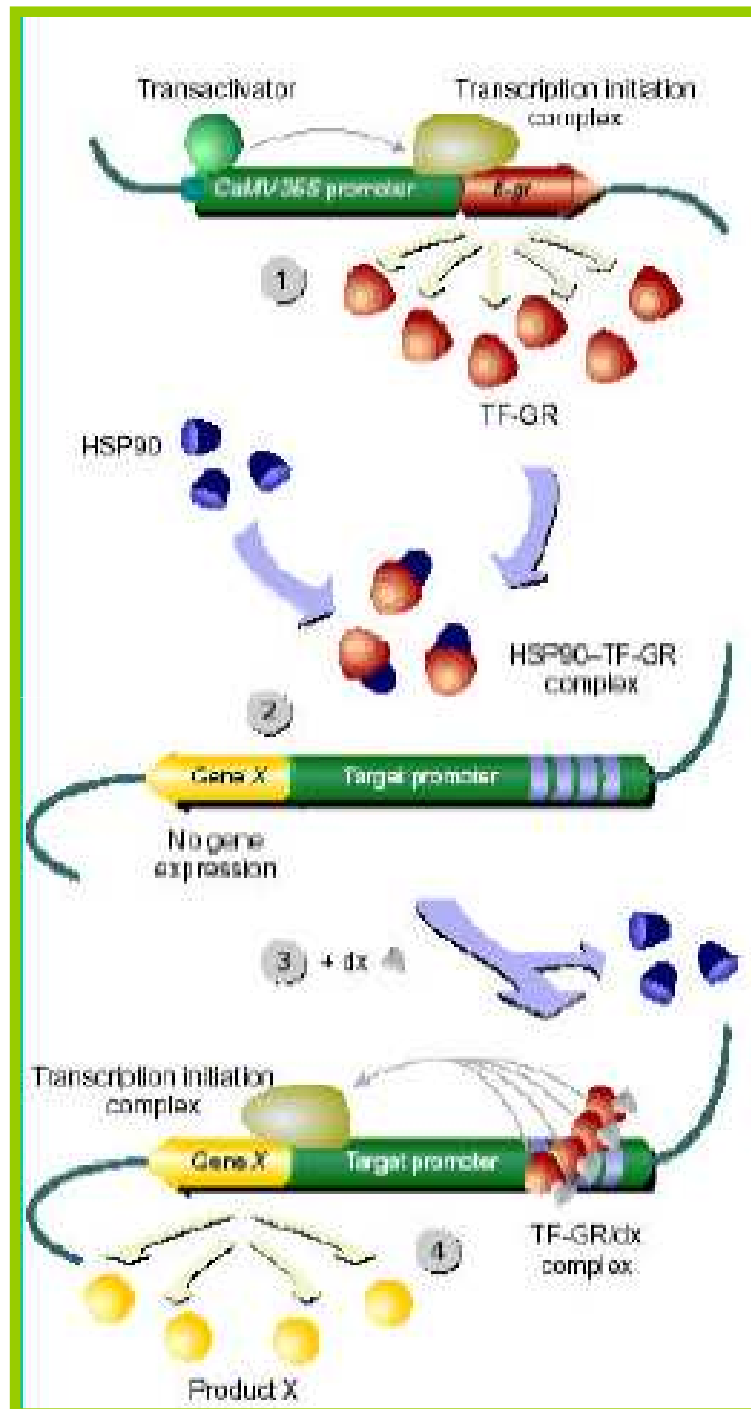
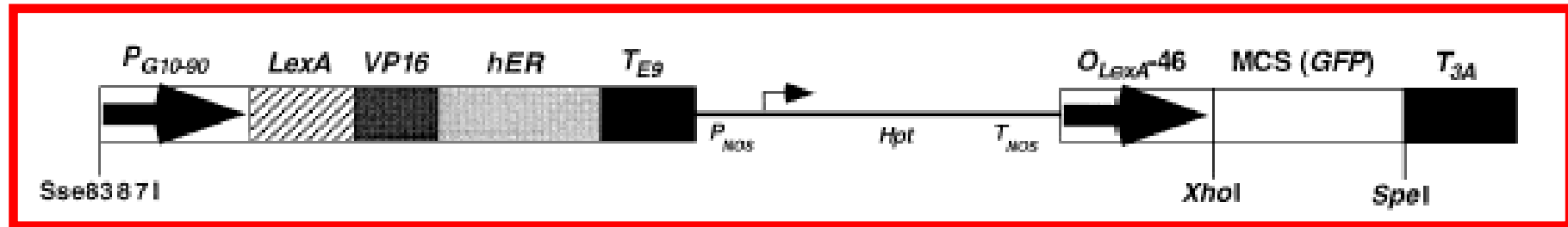


Fig. 4. The dexamethasone-inducible expression system. (1) The fusion protein TF-GR, consisting of a transcription factor (DNA binding domain and transcriptional activation domain) and the glucocorticoid binding domain, is expressed under the control of a strong promoter (e.g. CaMV 35S promoter). (2) In the absence of dexamethasone the activator is trapped by the formation of an inactive complex with HSP90. (3) The binding of dexamethasone mediates dissociation from HSP90 and allows binding of the activator to a target promoter that contains multiple TF-GR binding sites upstream of a short DNA fragment that encodes the TATA box. (4) Transcription from the target promoter is induced. TF can be any transcription factor that contains a DNA-binding domain and an activation domain. Aoyama and Chua have used the DNA-binding domain of yeast transcription factor GAL4 and the acid activation domain of *Herpes simplex* virus protein 16 (Ref. 9).

svantaggio: background
elevato in assenza di ormone

SISTEMA DI ESPRESSIONE INDUCIBILE BASATO SUL RECETTORE DEGLI ESTROGENI



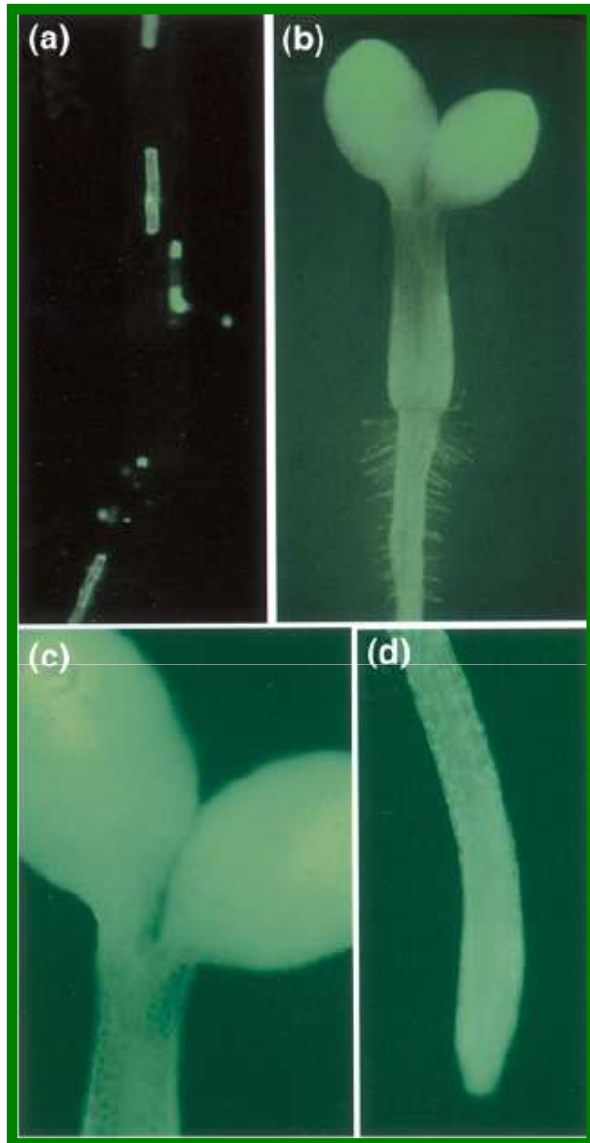
Vettore XVE

Un forte promotore costitutivo (G10-90) controlla l'espressione del gene di fusione XVE

X: DNA binding domain di LexA

V: dominio acido di attivazione di VP16

ER: region C-terminale del recettore umano degli estrogeni



espressione della *GFP* indotta da 2 μM
estradiolo

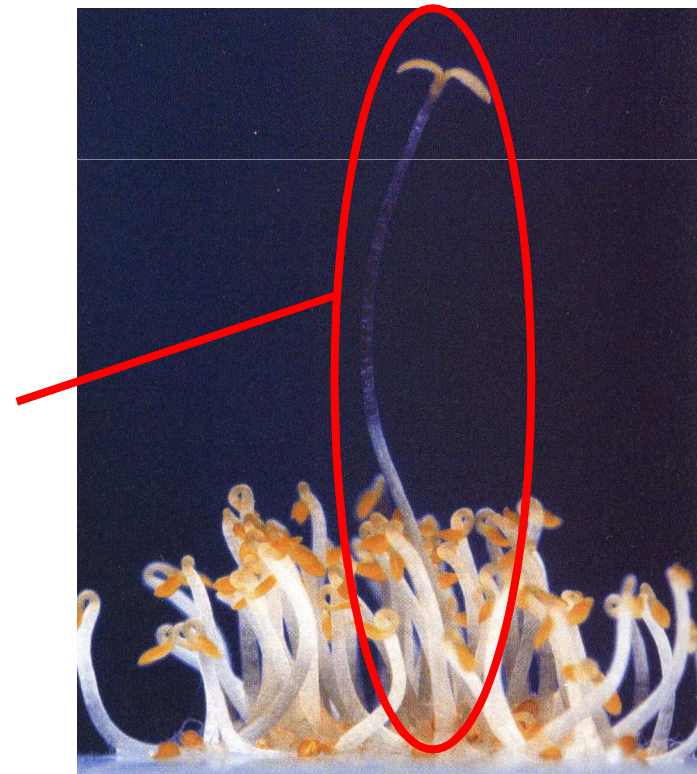
- E' strettamente inducibile da estradiolo
(No background)
- Livelli di espressione della *GFP* fino a 8
volte superiori rispetto a quelli
ottenuti con *35S::GFP*
- Sistema non tossico per la pianta e
senza effetti fisiologici aspecifici

esempio: QUAL E' IL RUOLO DEL GENE ETR1?

Identificazione del gene ETR1 mediante genetica tradizionale

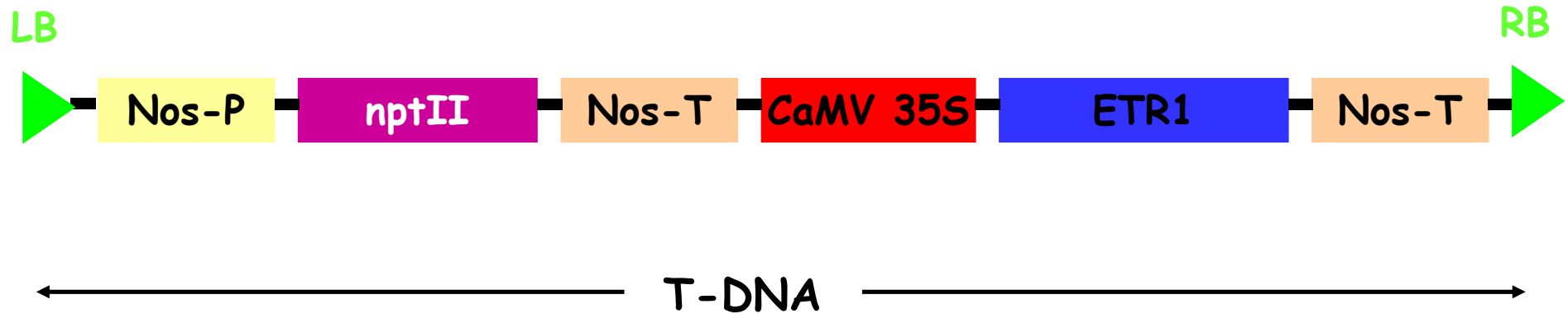
mutazioni del gene ETR1 determinano un fenotipo insensibile all'etilene

assenza di risposta tripla in presenza di etilene



esempio: QUAL E' IL RUOLO DEL GENE ETR1?

conferma della funzione del gene ETR1
mediante sovraespressione



EFFETTO



Aumento della capacità di legare l'etilene



ETR1 è il recettore dell'etilene

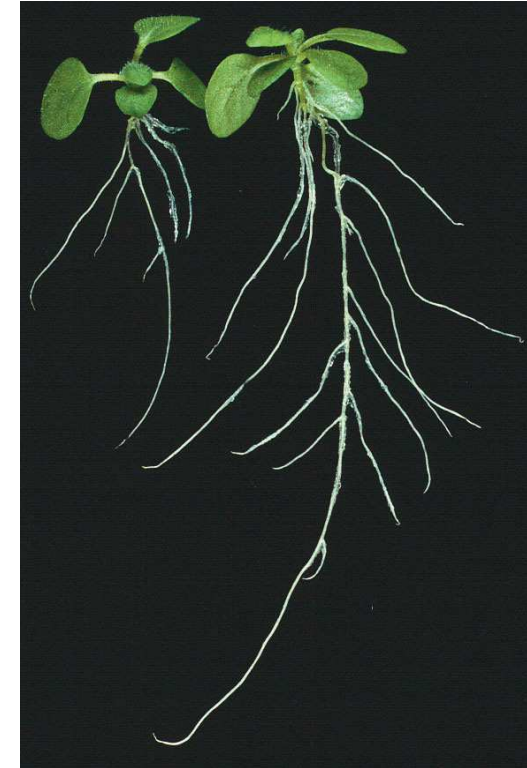
esempio:

Sovraespressione del gene per la citochinina ossidasi



la crescita del germoglio
è fortemente inibita

ridotti livelli
di citochinine



maggior
crescita delle
radici

**Le citochinine stimolano lo sviluppo del
germoglio ed inibiscono quello della radice**

Per studiare l'effetto della sovraespressione di un gene lo si può far esprimere in maniera transiente

ESPRESSIONE TRANSIENTE

La pianta non viene trasformata stabilmente

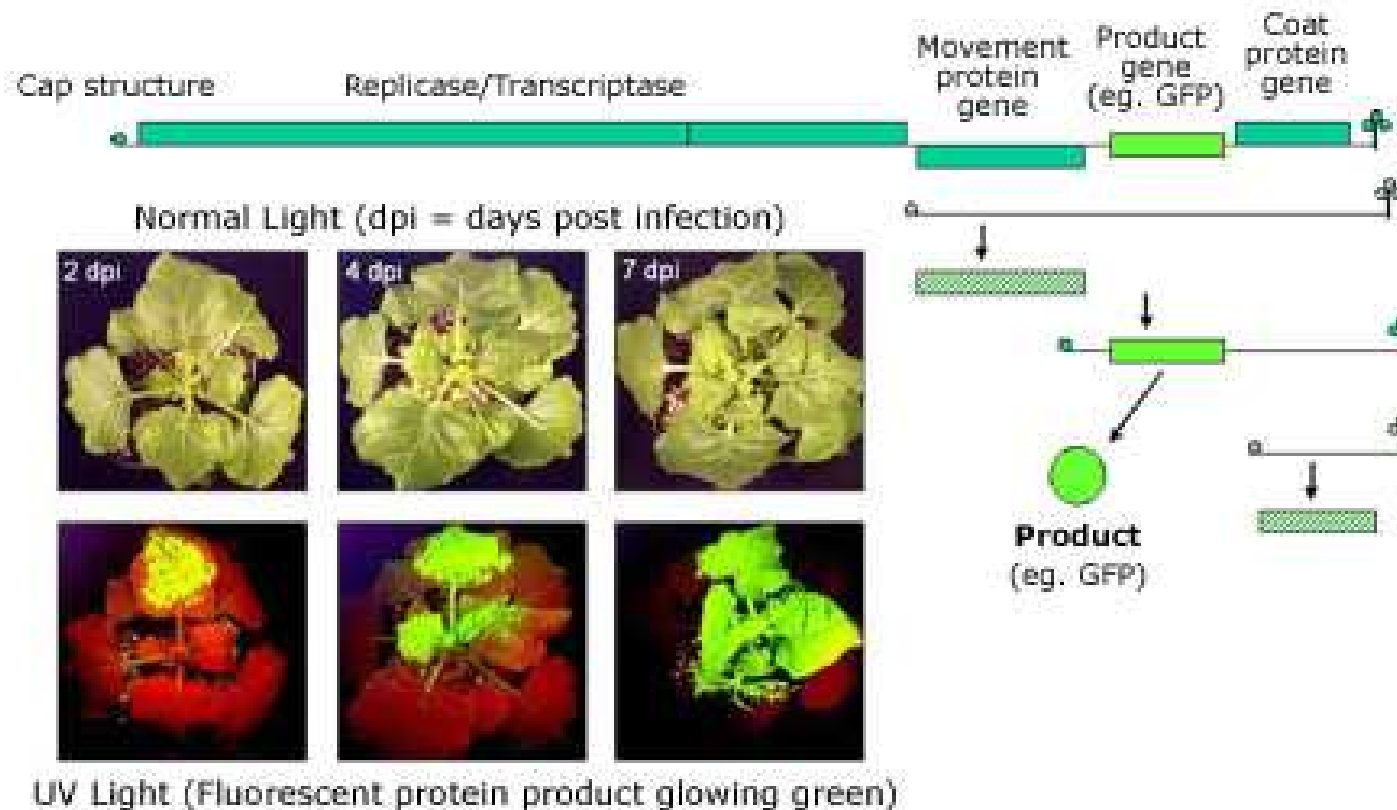
Il transgene non viene integrato e non viene quindi trasferito alla progenie

- **Agrobacterium - agroinfiltration**
- **Sistema biolistico**
- **Espressione in protoplasti** – trasformazione mediante elettroporazione o PEG
- **Espressione mediata da virus** – infezione con Potato virus X (PVX) o Tomato mosaic virus (TMV)



Espressione di geni in pianta mediante l'uso di VETTORI VIRALI

LSBC's GENEWARE® Free-Protein Expression Vectors



Espressione di geni in pianta mediante l'uso di vettori virali

VANTAGGI

- ❖ Elevato numero di copie di genoma virale per cellula



alti livelli di espressione del gene

- ❖ Facile introduzione e diffusione autonoma nella pianta (plasmodesmi - sistema vascolare)
- ❖ Assenza di effetto di posizione

SVANTAGGI

- ❖ Sintomi virali nella pianta infettata (possono interferire con l'effetto indotto dall'espressione del gene)
- ❖ Elevata velocità di mutazione spontanea

Vettori virali

Vector	Species ^a	Viral symptoms	Efficiency ^b	Adopted for large-scale studies	Reference
TMV	<i>N. benthamiana</i>	Severe	Fair; better with antisense Improved with inclusion of direct inverted repeats	Yes	Kumagai <i>et al.</i> (1995), Lacomme <i>et al.</i> (2003), Fitzmaurice <i>et al.</i> (2002)
PVX	<i>N. benthamiana</i>	Moderate	Fair; not persistent	Yes	Ruiz <i>et al.</i> (1998), Lu <i>et al.</i> (2003)
TGMV	<i>N. benthamiana</i>	Variable	Fair; varies with gene silenced, size of insert	No	Kjemtrup <i>et al.</i> (1998), Peele <i>et al.</i> (2001)
TRV	<i>N. benthamiana</i>	Mild	Good; persistent and consistent between experiments	Yes, available for GATEWAY cloning	Ratcliff <i>et al.</i> (2001), Liu <i>et al.</i> (2002b)
	Tomato	Mild	Variable; depends on inoculation technique	Yes, available for GATEWAY cloning	Liu <i>et al.</i> (2002a)
SVISS	Tobacco	Mild	Good; persistent and consistent between experiments	No	Gossele <i>et al.</i> (2002)
BSMV	Barley	Moderate	Fair; depends on target sequence; not persistent Improved with use of direct inverted repeats of targeting sequence	Yes	Holzberg <i>et al.</i> (2002), Lacomme <i>et al.</i> (2003), Fitzmaurice <i>et al.</i> (2002)
CbLCV	<i>Arabidopsis</i>	Moderate in older plants	Fair; effects variable with gene silenced and vector design	No	Turnage <i>et al.</i> (2002)

TMV, tobacco mosaic virus; PVX, potato virus X; TGMV, tomato golden mosaic virus; TRV, tobacco rattle virus; SVISS, satellite virus-induced silencing system; BSMV, barley stripe mosaic virus; CbLCV, cabbage leaf curl virus.

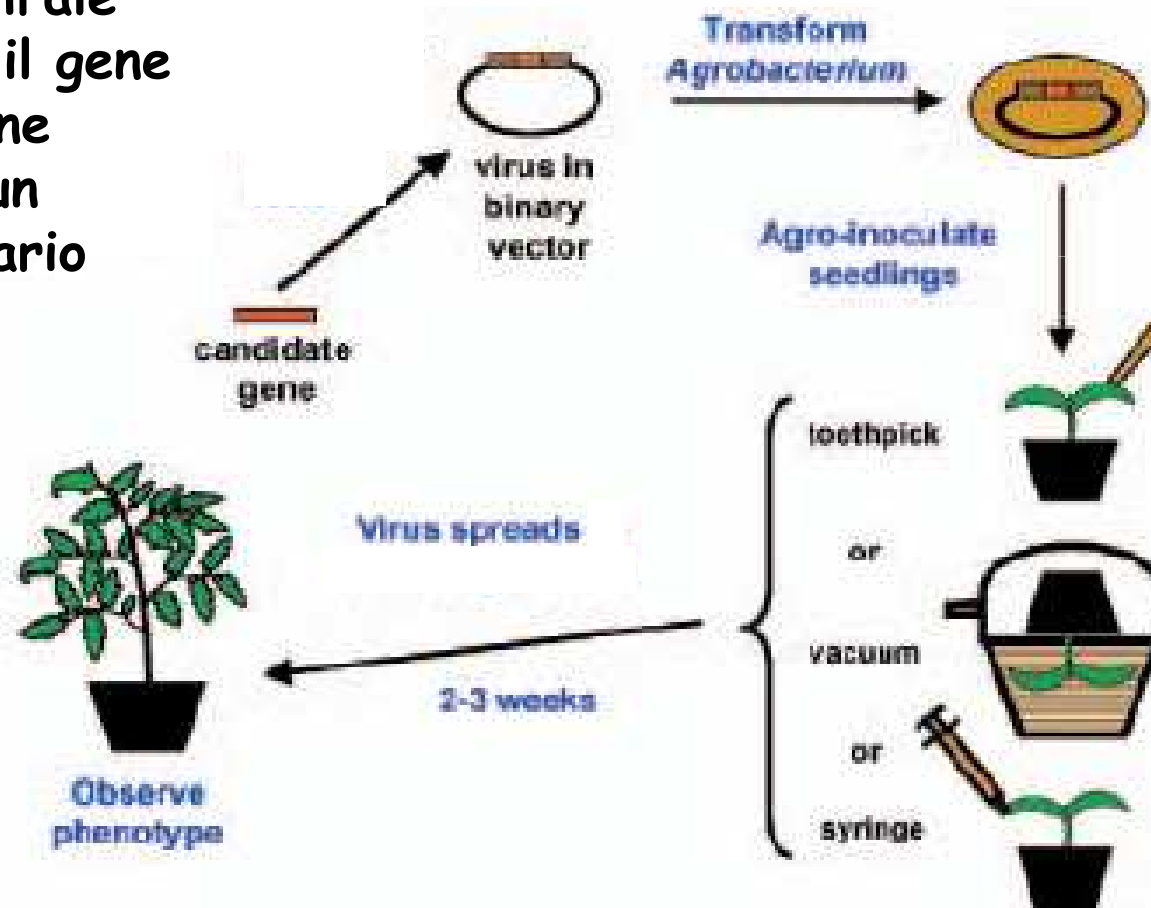
^aPlant species in which silencing has been shown to be effective.

^bEfficiency is the percentage of leaf area that shows evidence of silencing and the degree of silencing that occurs.

Per infettare la pianta i vettori virali a RNA richiedono la trascrizione in vitro

Sistema alternativo **AGROINOCULAZIONE**

Il genoma virale contenente il gene esogeno viene inserito in un vettore binario

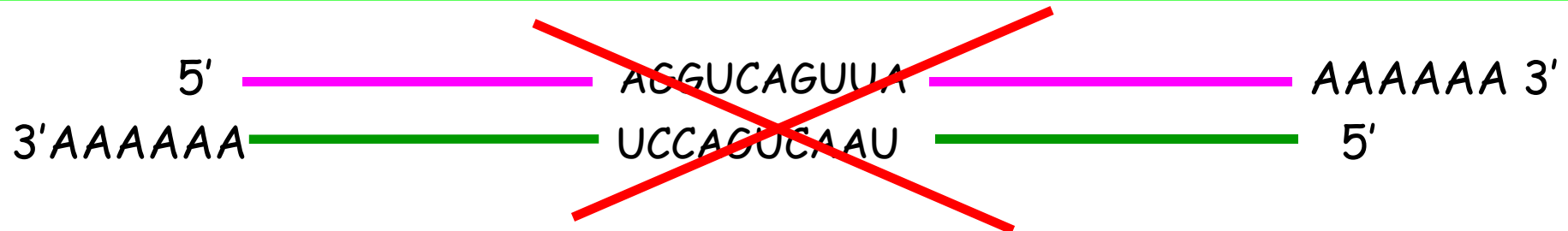
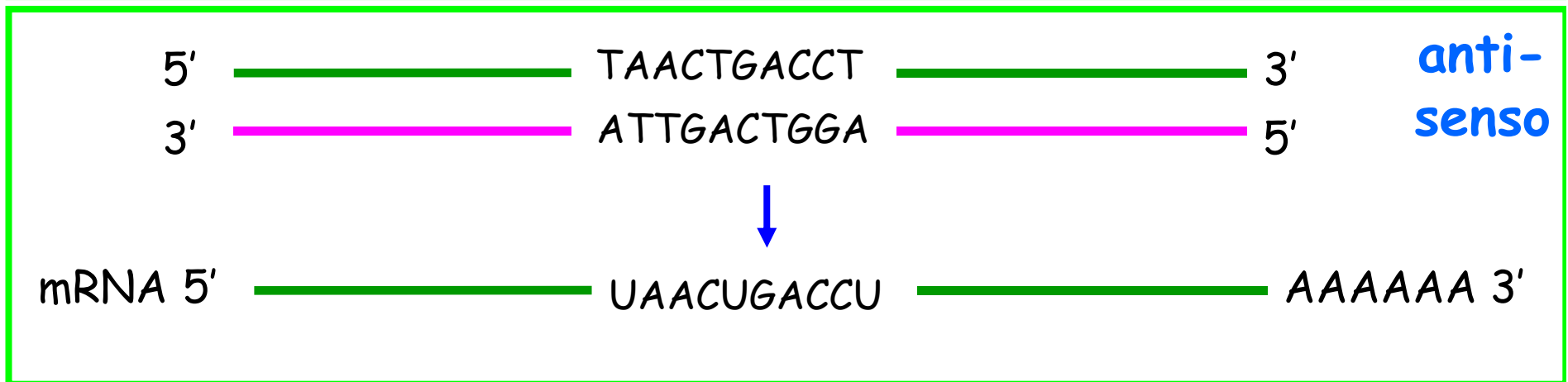
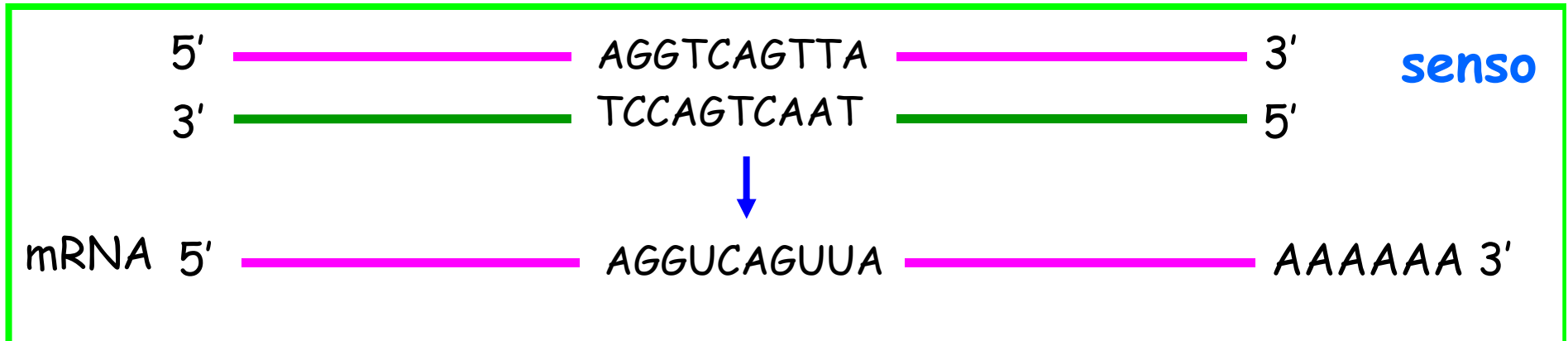


Come si studia la funzione
di un gene?

- ❖ Mutazioni del gene → effetto sul fenotipo
 - genetica forward (tradizionale)
 - genetica reverse (inversa)
 - ❖ Aumento dell'espressione del gene
 - sovraespressione costitutiva ectopica
- ❖ Riduzione/silenziamento del gene
 - antisenso
 - RNAi

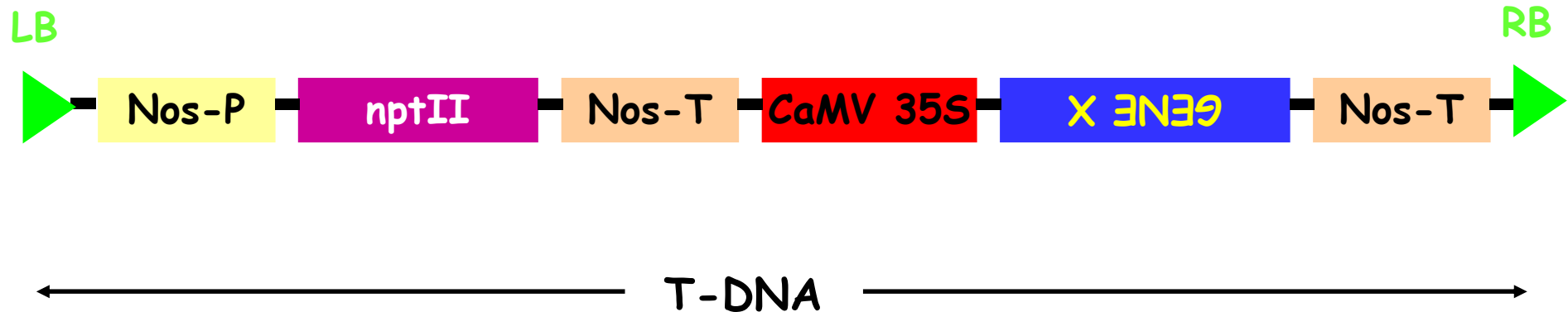
Riduzione dell'espressione di un gene

Strategia ANTI-SENSO



Riduzione dell'espressione di un gene di interesse

ANTISENSO



- Trasformazione della pianta
- Analisi del fenotipo
- Saggi biochimico-funzionali

SILENZIAMENTO GENICO

RNA interference (RNAi) - Animali
(scoperto in *C. elegans*)

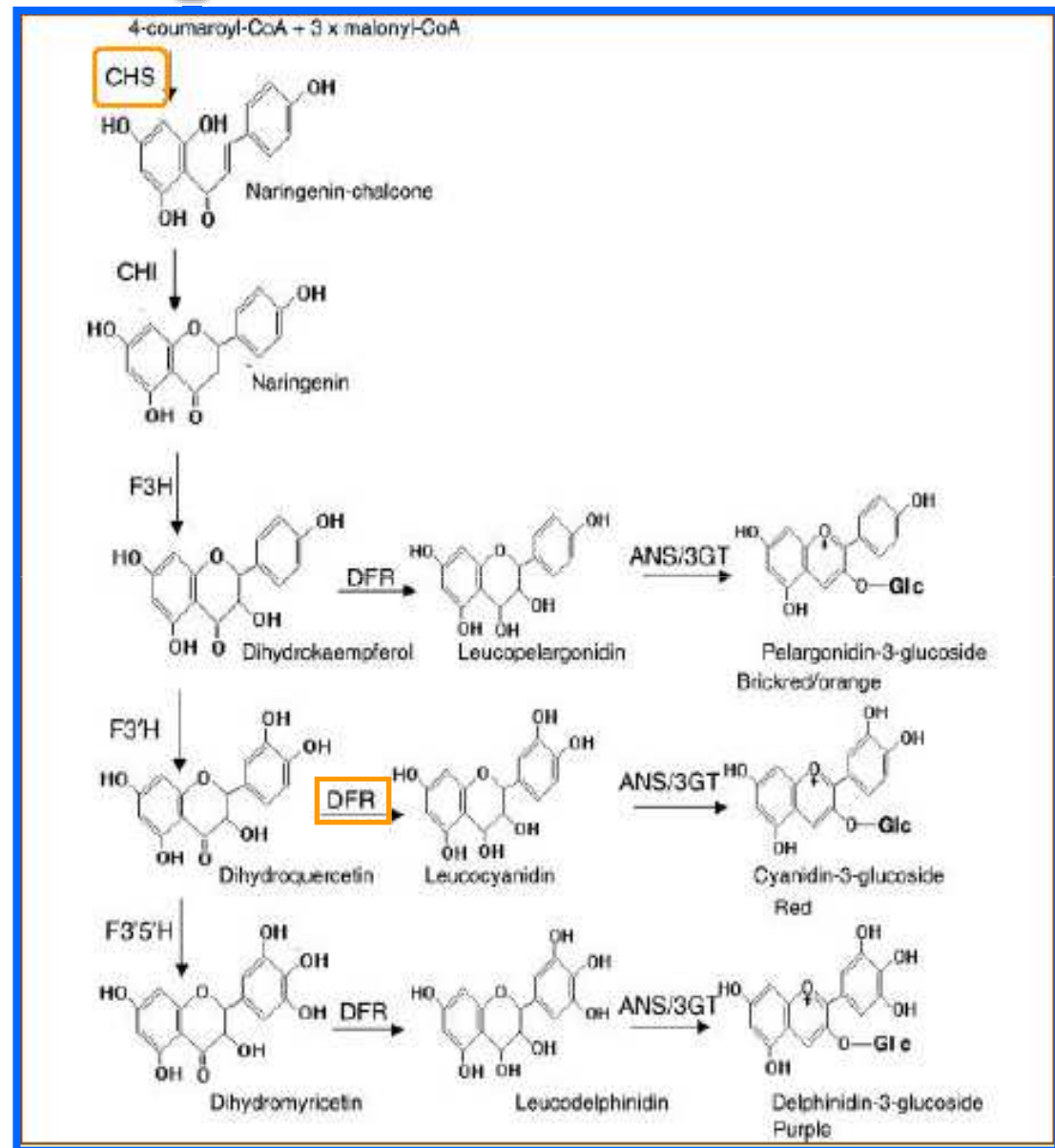
Quelling - funghi
(*Neurospora crassa*)

**Post-transcriptional
gene silencing** - Piante

PTGS Post-transcriptional gene silencing

1^a evidenza

Sovraespressione di geni codificanti enzimi della via biosintetica dei flavonoidi in piante di Petunia allo scopo di incrementare il contenuto di **ANTOCIANINE** (pigmenti responsabili della colorazione dei fiori)

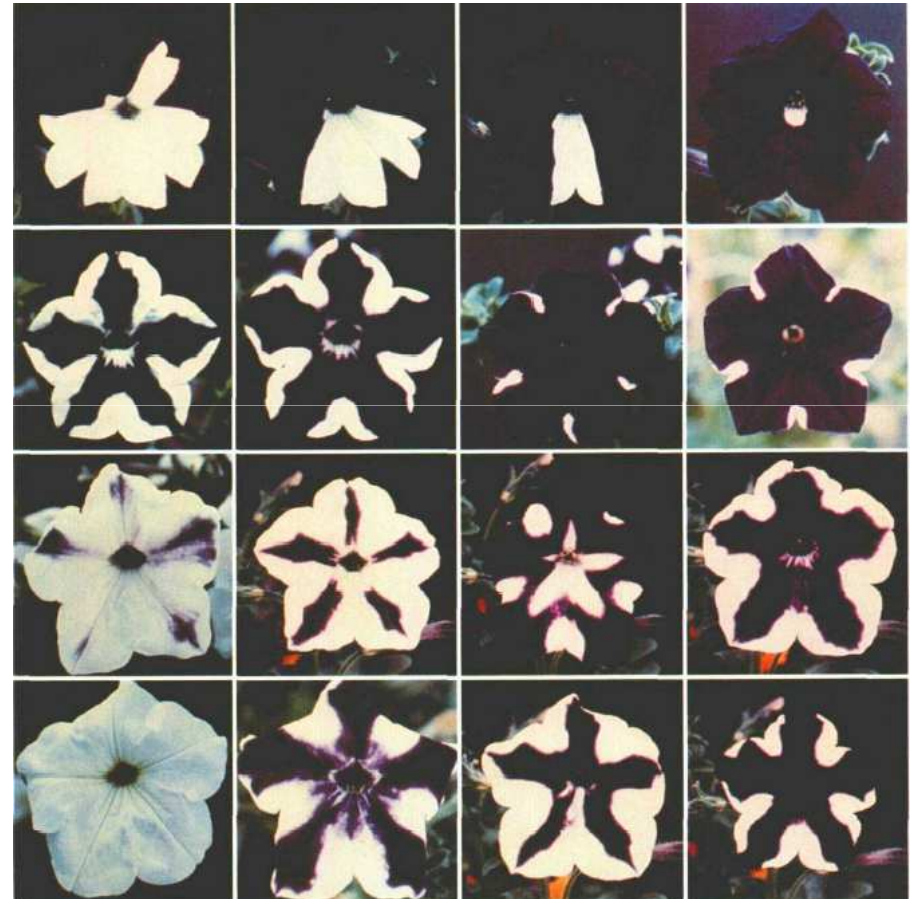


PTGS Post-transcriptional gene silencing

Sovraespressione della Calcone sintasi in Petunia per incrementare la colorazione viola del fiore



Co-soppressione del gene endogeno



Napoli et al. 1990 Plant Cell

PTGS Post-transcriptional gene silencing

Sovraespressione della DFR
(diidroflavonolo-4-reduttasi)



Co-soppressione del gene
endogeno



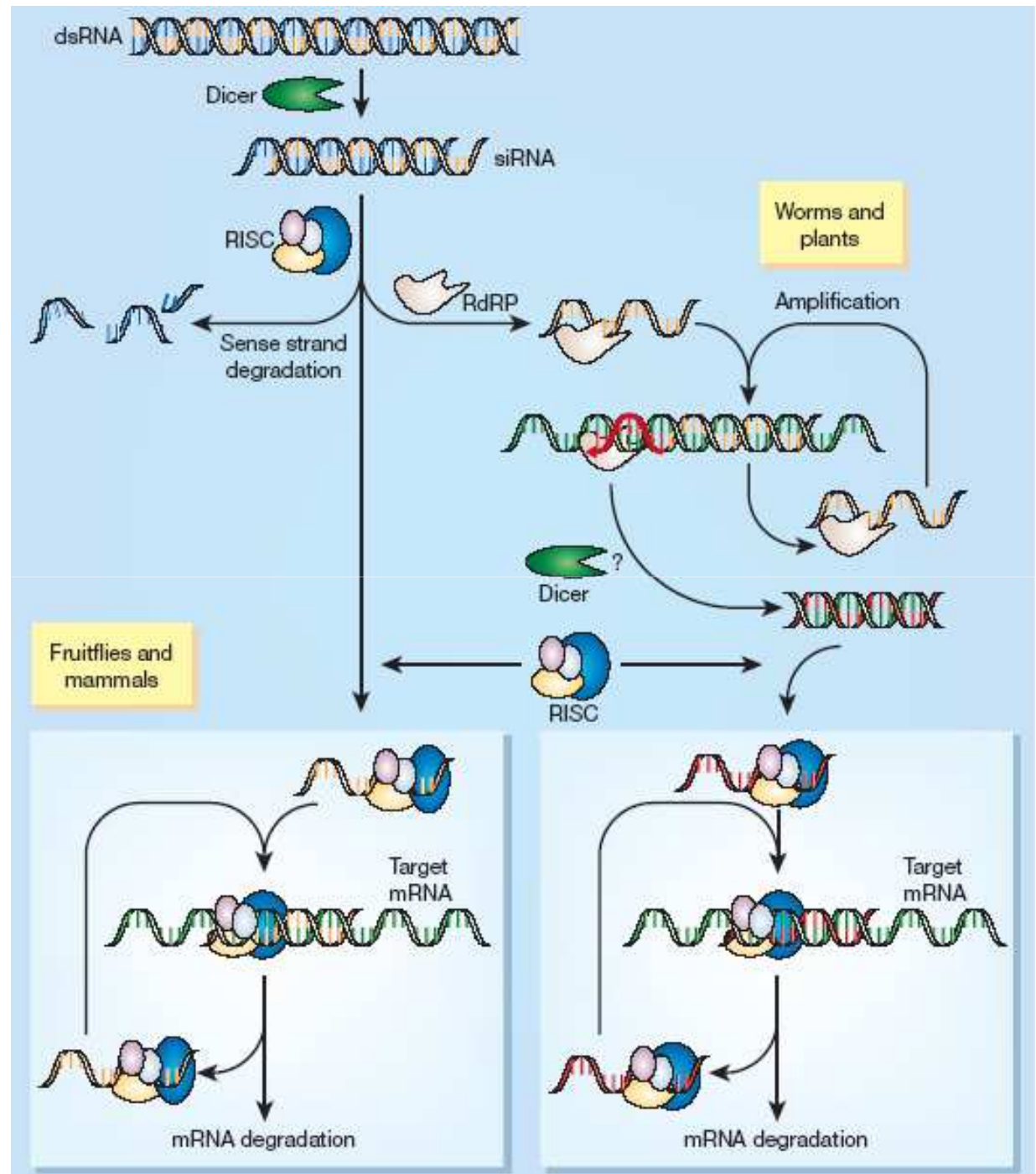
van der Krol et al. 1990 Plant Cell

meccanismo dell'RNAi

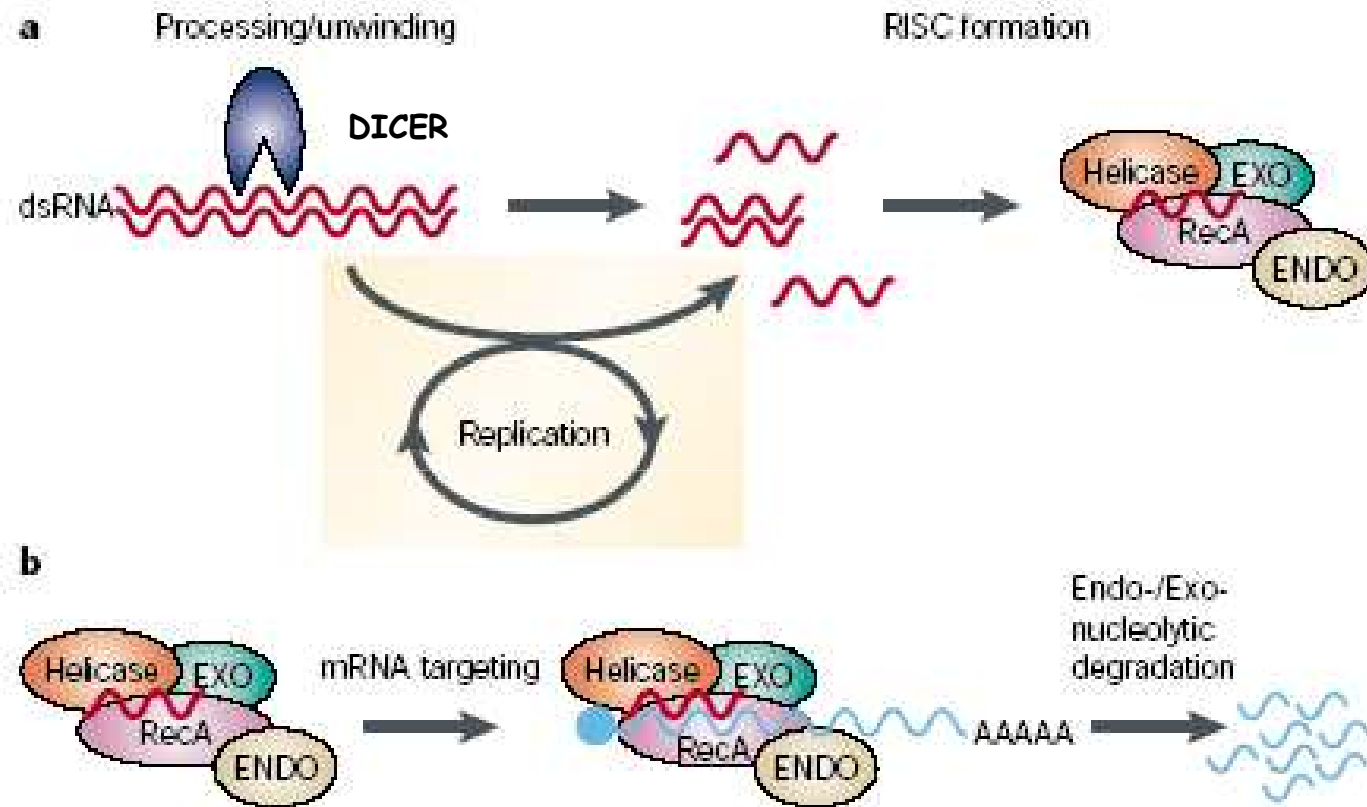
da un RNA a doppio filamento si formano degli **short interfering RNA (siRNA)** ad opera dell'enzima **DICER** che ha un dominio RNAsi III

RISC: RNA-induced silencing complex

RdRP: RNA-dependent RNA polymerase
E' responsabile di un meccanismo di amplificazione



meccanismo dell'RNAi



In *Arabidopsis* sono state identificate proteine DICER-like e proteine ARGONAUTE che fanno parte del RISC

CHE RUOLO HA L'RNAi NELLE PIANTE?

Regolazione dell'espressione genica

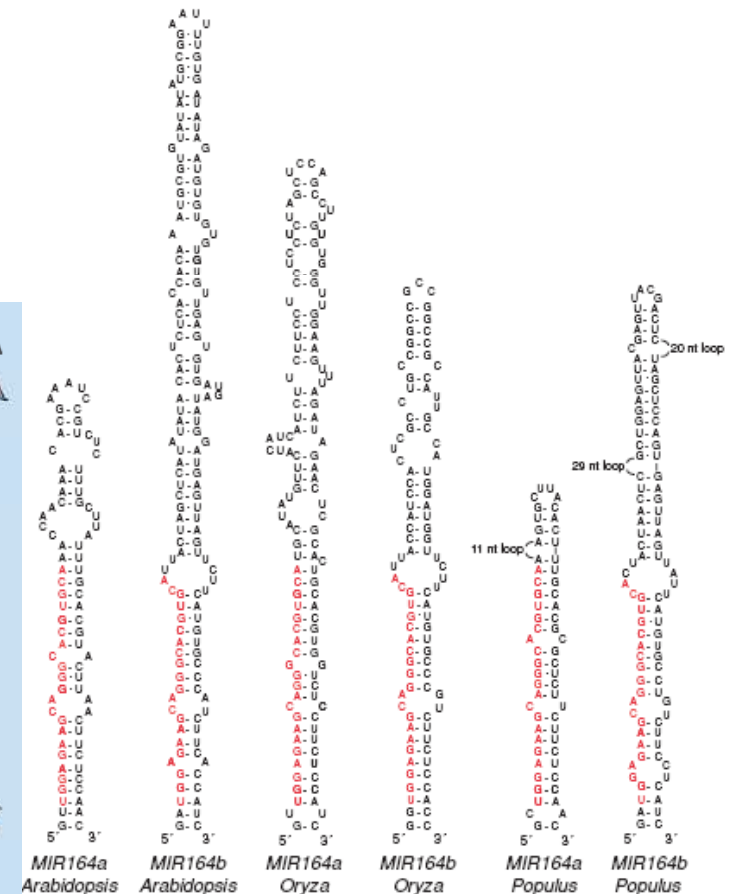
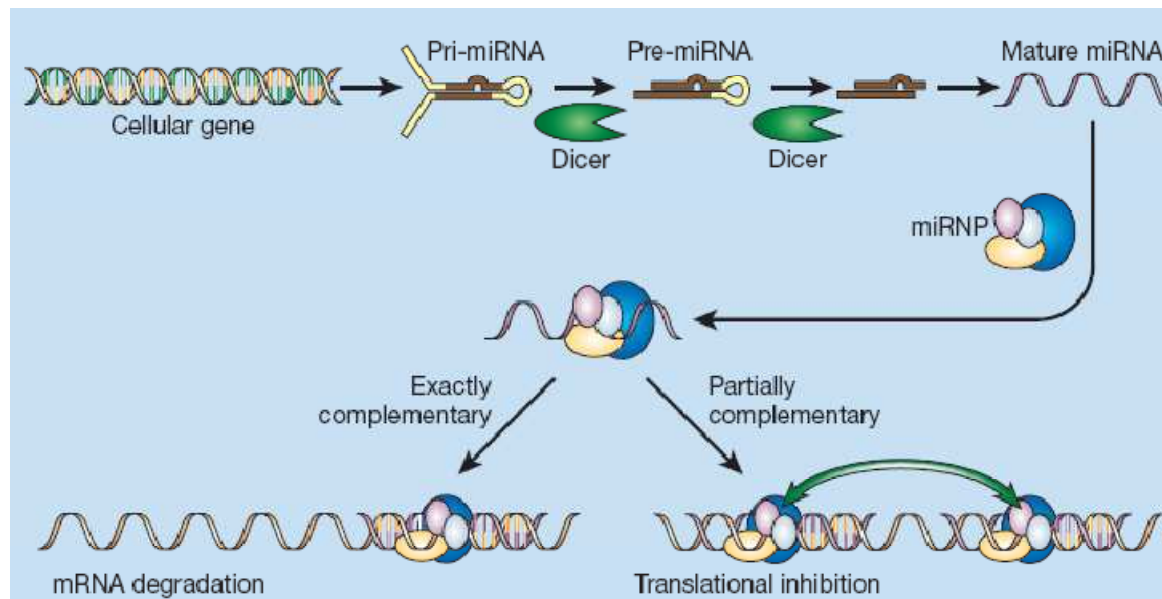
Meccanismo di difesa dall'infezione virale

MicroRNA (miRNA)

Una classe di RNA di circa 22nt codificati dal genoma che appaiandosi a mRNA endogeni ne determina la degradazione impedendo la sintesi proteica



Regolazione dell'espressione genica



miRNA vegetali

CHE RUOLO HA L'RNAi NELLE PIANTE?

Regolazione dell'espressione genica

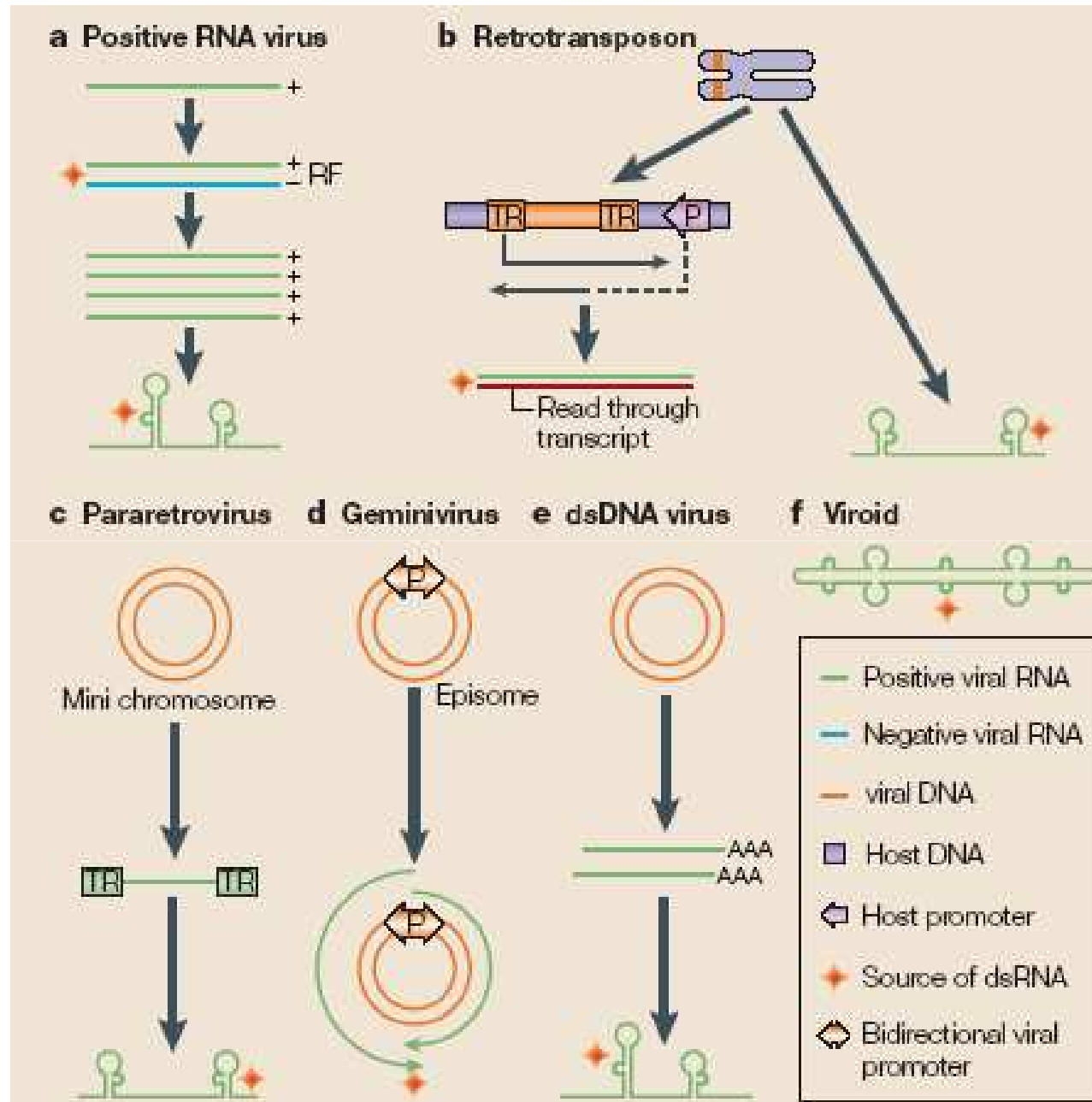
Meccanismo di difesa dall'infezione virale

Meccanismo di difesa dall'infezione virale

La maggior parte dei virus vegetali sono virus a ssRNA

la replicazione avviene ad opera di una
RNA polimerasi RNA-dipendente che
determina la formazione di dsRNA

Meccanismo di difesa dall'infezione virale



Meccanismo di difesa dall'infezione virale

VIRUS-INDUCED GENE SILENCING

virus vegetali che contengono sequenze omologhe a geni vegetali inducono il silenziamento di tali geni

Mutanti di Arabidopsis difettivi nel meccanismo di gene silencing mostrano un'aumentata sensibilità virale

Evoluzione di parte di alcuni virus di proteine di soppressione del VIGS

L'RNA silencing nelle piante ha natura sistemica

SYSTEMIC ACQUIRED SILENCING

piante *35S::Nia2* mostrano co-soppressione

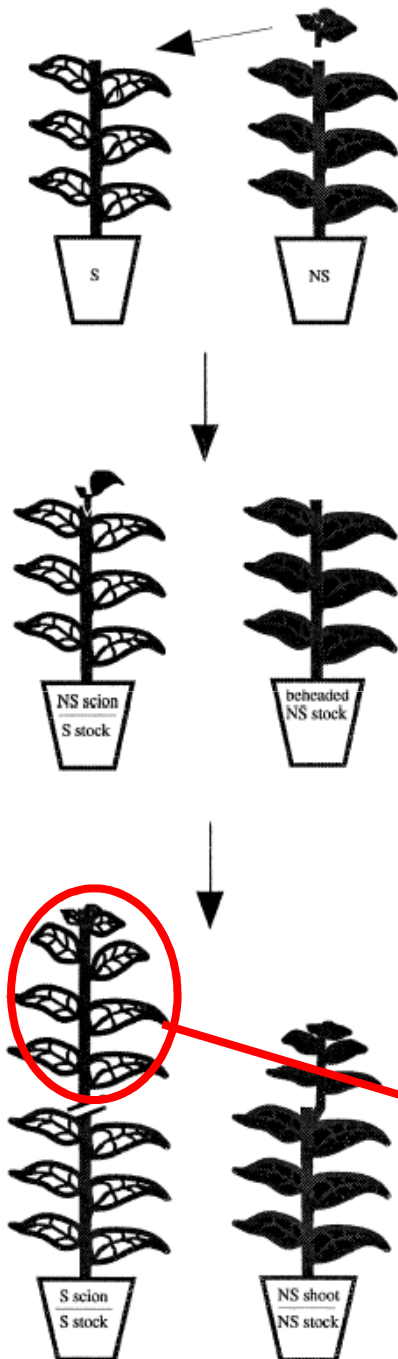


clorosi

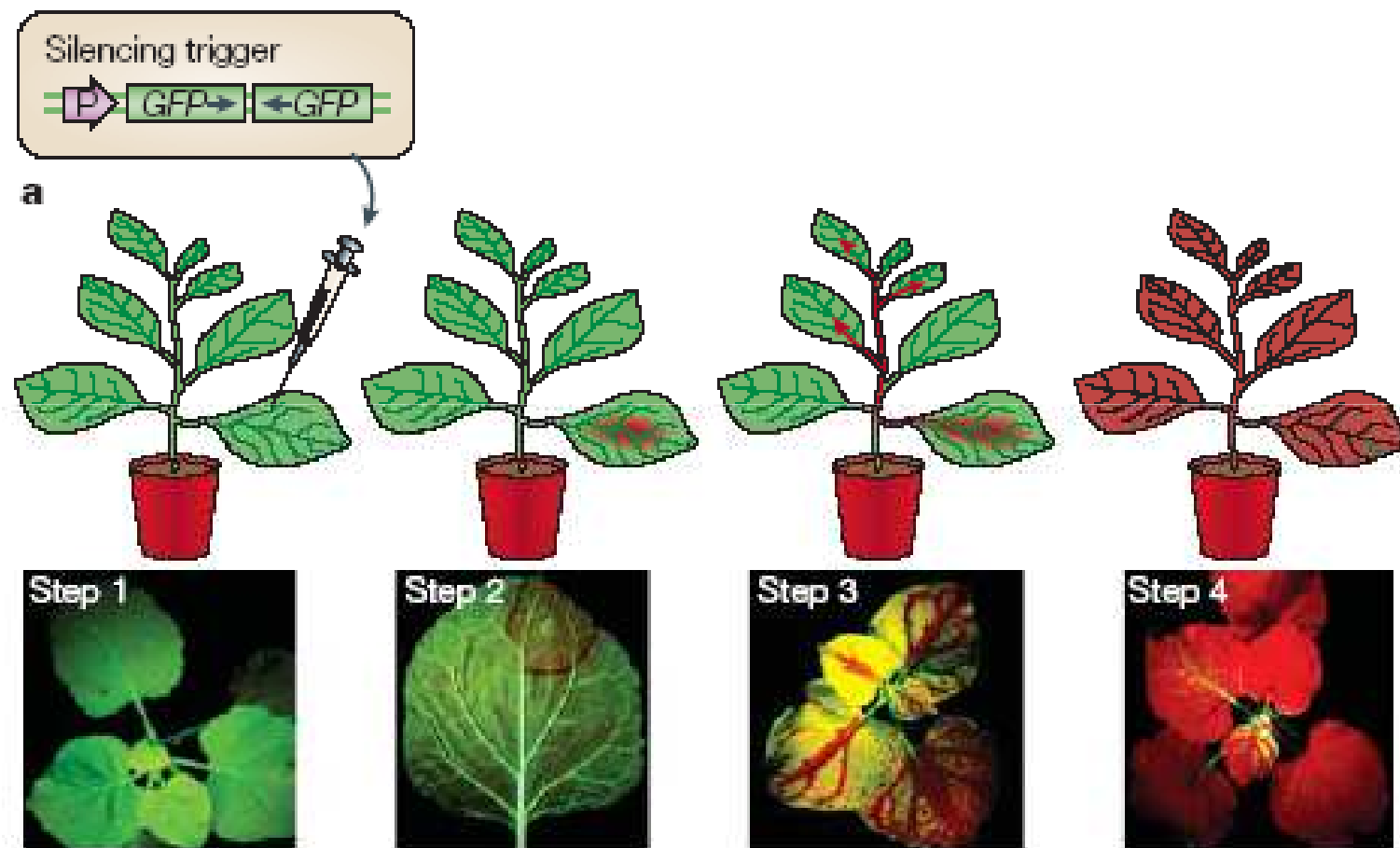
Trasmissione della co-soppressione della nitrato reduttasi in piante innestate

Il silencing è trasmesso da portainnesto silenziato ad innesto non silenziato

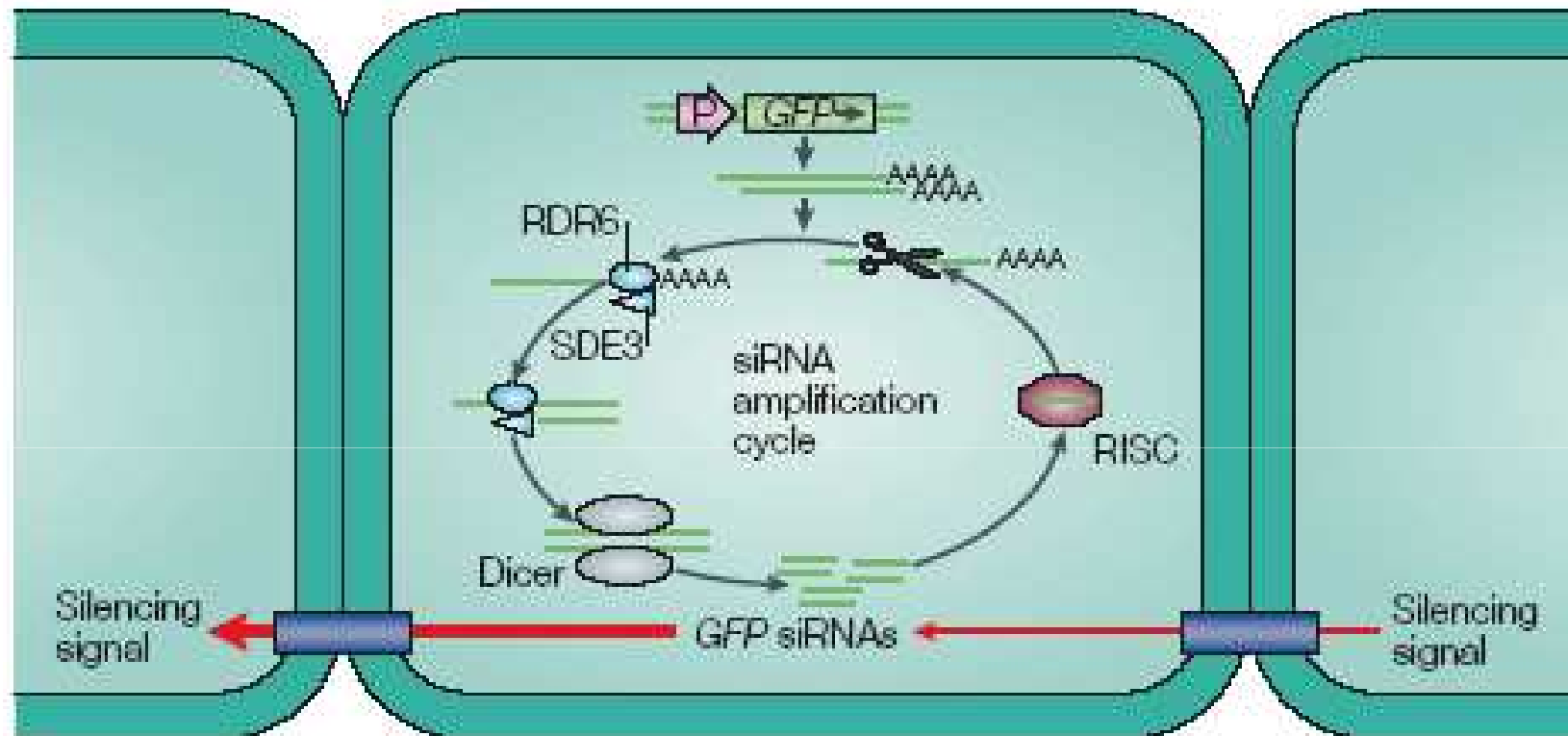
sintomi clorotici (silenziamento della nitrato-reduttasi) sulle foglie sviluppatesi sull'innesto



systemic acquired silencing



Qual è il segnale di silenziamento?



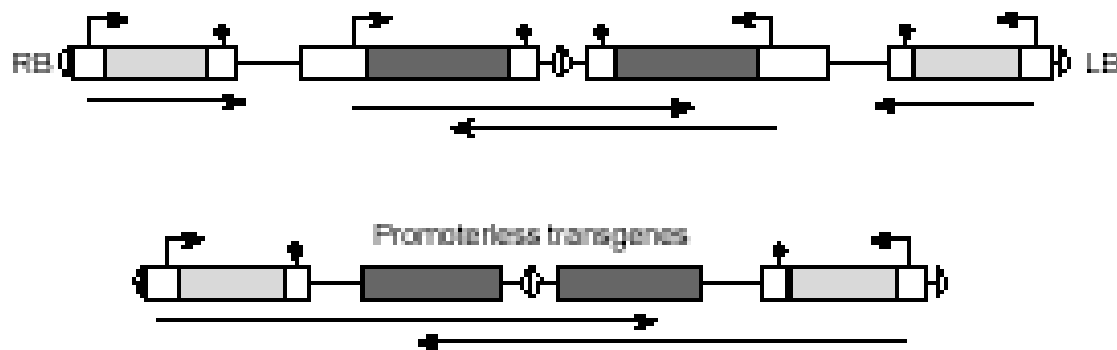
Gli siRNA prodotti diffondono attraverso i plasmodesmi
nelle cellule adiacenti

Quindi riassumendo:

Gene silencing indotto dal transgene

si ha la formazione di dsRNA, probabilmente a causa dell'integrazione del transgene ripetuto invertito, che innescano l'RNAi

(a) Inverted repeated transgenes

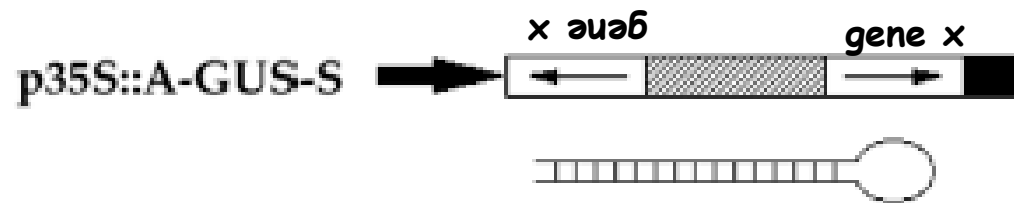


Uso del POST-TRANSCRIPTIONAL
GENE SILENCING (RNAi) per lo
studio della funzione dei geni vegetali

Bloccare l'espressione di un gene endogeno

Studio della funzione dei geni mediante
la genetica inversa

Trasformazione della pianta (Agrobacterium, sistema biolistico) con costrutti che determinino la formazione di **dsRNA** capaci di indurre l'RNAi



struttura
stem-loop
(hairpin RNA)

ripetizioni invertite separate da uno spacer

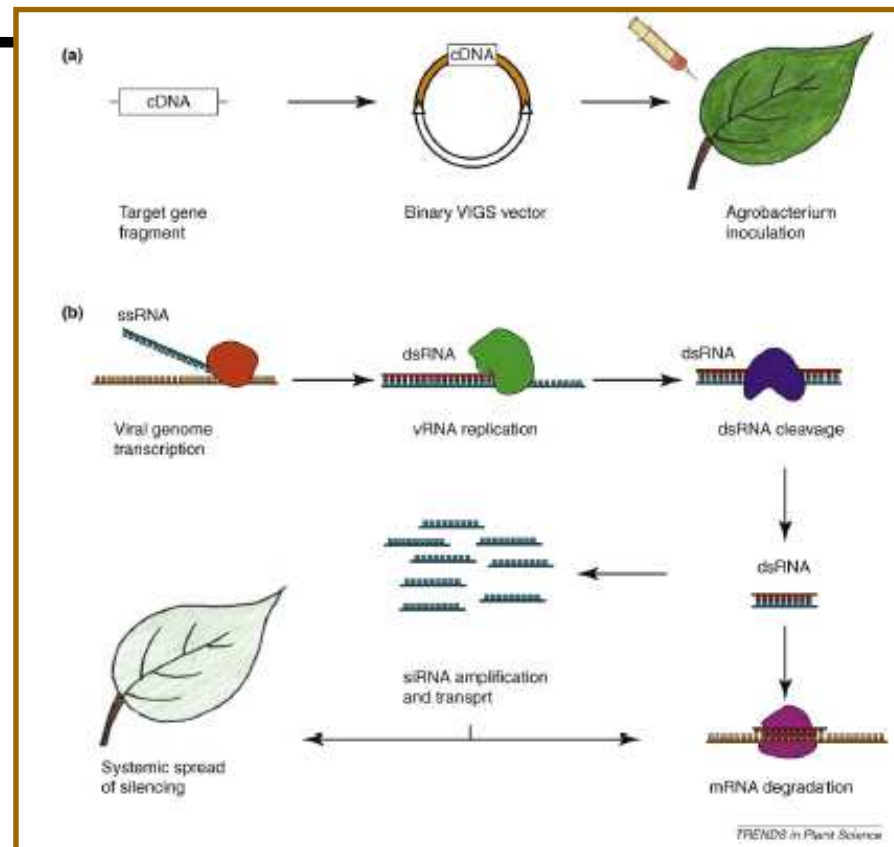
hpRNA		55 %
ihpRNA		90 %



l'uso di un introne come spacer aumenta l'efficienza di PTGS

VIRUS-INDUCED GENE SILENCING

virus vegetali che contengono sequenze omologhe a geni vegetali inducono il silenziamento di tali geni



Vettori virali

Vector	Species ^a	Viral symptoms	Efficiency ^b	Adopted for large-scale studies	Reference
TMV	<i>N. benthamiana</i>	Severe	Fair; better with antisense Improved with inclusion of direct inverted repeats	Yes	Kumagai <i>et al.</i> (1995), Lacomme <i>et al.</i> (2003), Fitzmaurice <i>et al.</i> (2002)
PVX	<i>N. benthamiana</i>	Moderate	Fair; not persistent	Yes	Ruiz <i>et al.</i> (1998), Lu <i>et al.</i> (2003)
TGMV	<i>N. benthamiana</i>	Variable	Fair; varies with gene silenced, size of insert	No	Kjemtrup <i>et al.</i> (1998), Peele <i>et al.</i> (2001)
TRV	<i>N. benthamiana</i>	Mild	Good; persistent and consistent between experiments	Yes, available for GATEWAY cloning	Ratcliff <i>et al.</i> (2001), Liu <i>et al.</i> (2002b)
	Tomato	Mild	Variable; depends on inoculation technique	Yes, available for GATEWAY cloning	Liu <i>et al.</i> (2002a)
SVISS	Tobacco	Mild	Good; persistent and consistent between experiments	No	Gossele <i>et al.</i> (2002)
BSMV	Barley	Moderate	Fair; depends on target sequence; not persistent Improved with use of direct inverted repeats of targeting sequence	Yes	Holzberg <i>et al.</i> (2002), Lacomme <i>et al.</i> (2003), Fitzmaurice <i>et al.</i> (2002)
CbLCV	<i>Arabidopsis</i>	Moderate in older plants	Fair; effects variable with gene silenced and vector design	No	Turnage <i>et al.</i> (2002)

TMV, tobacco mosaic virus; PVX, potato virus X; TGMV, tomato golden mosaic virus; TRV, tobacco rattle virus; SVISS, satellite virus-induced silencing system; BSMV, barley stripe mosaic virus; CbLCV, cabbage leaf curl virus.

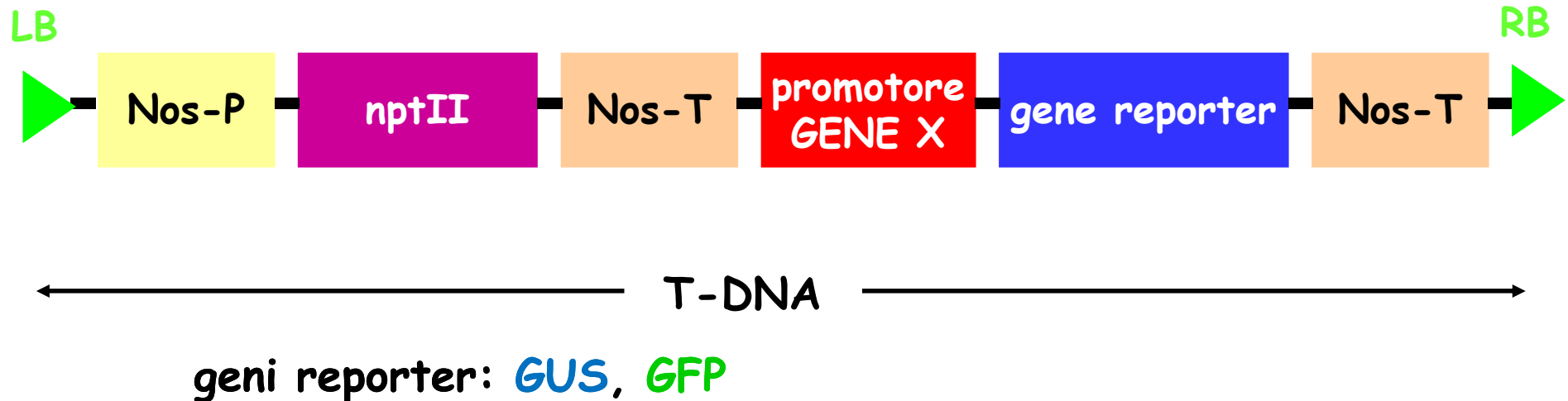
^aPlant species in which silencing has been shown to be effective.

^bEfficiency is the percentage of leaf area that shows evidence of silencing and the degree of silencing that occurs.

devono contenere sequenze di almeno 23 nt 100% omologhe al gene da silenziare

Per studiare la funzione di un gene è importante sapere in quali cellule, in quale tessuto o in quale organo quel gene è espresso

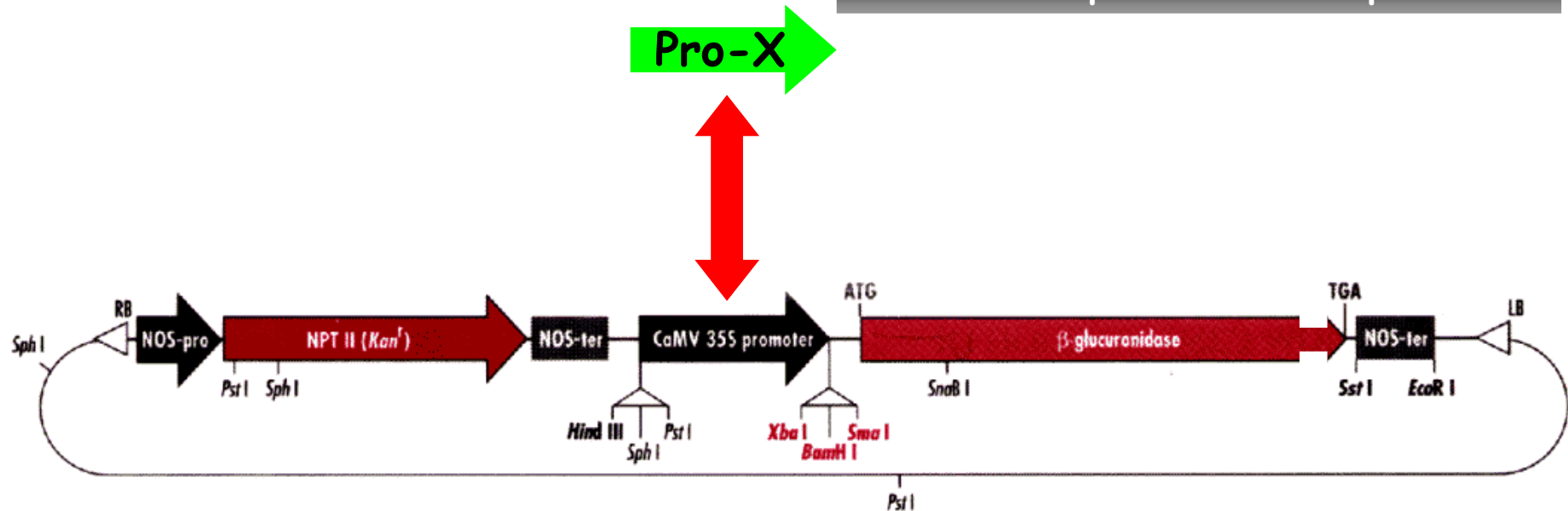
Studio dell'espressione di un promotore



- Trasformazione della pianta
- Analisi dell'espressione del gene reporter

permette di sapere in quale organo o tessuto è espresso il "gene X"

Studio dell'espressione di un promotore

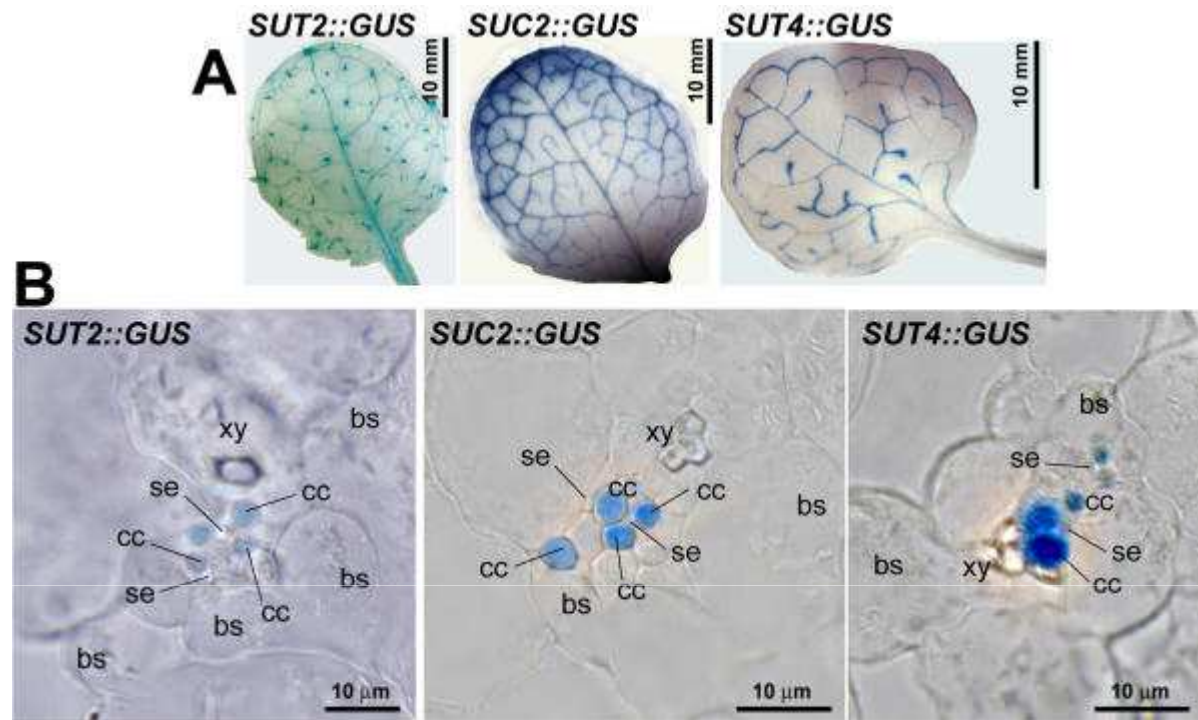


pBI121

.....
 TCT AGA GGA TCC CCG GGT GGT CAG TCC CTT ATG
 Xba I BamH I Sma I

from Clontech
catalogue 1996 / 97

Studio dell'espressione di un promotore



promotori
trasportatori del
saccarosio

espressione
AUX1

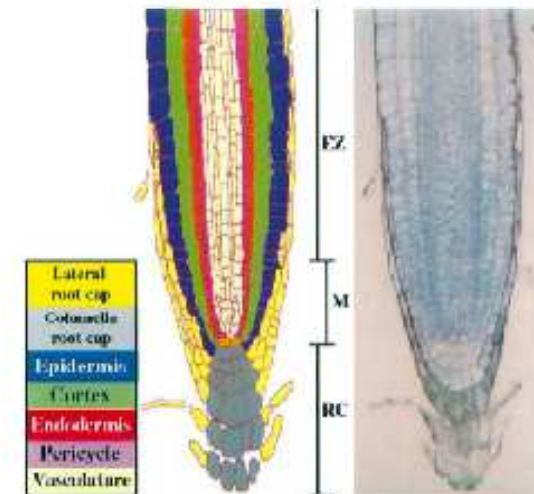


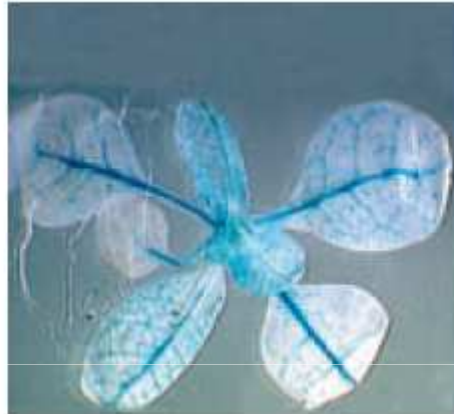
Fig. 5. (A) Schematic illustration of root apical tissues delineating root cap (RC), meristematic (M) and elongation zone (EZ). (B) The *AUX1* promoter drives GUS reporter gene expression within the majority of tissues within the primary root apex with the exception of the upper three tiers of columella cells within the root cap. Nine-day transgenic *Arabidopsis* seedlings were stained for GUS activity using conditions designed to minimize diffusion (see Materials and methods), embedded, then sectioned and viewed under bright field.

GA1::GUS

(A) Pianticella di 5 giorni



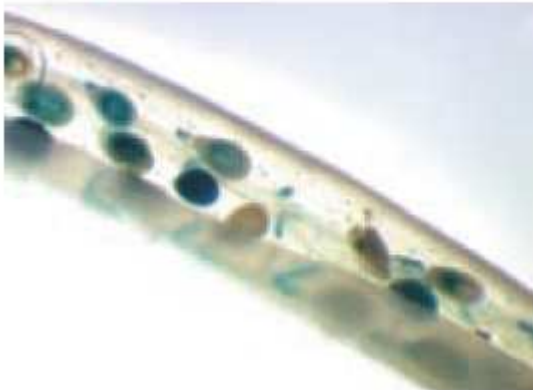
(B) Pianticella di 3 settimane



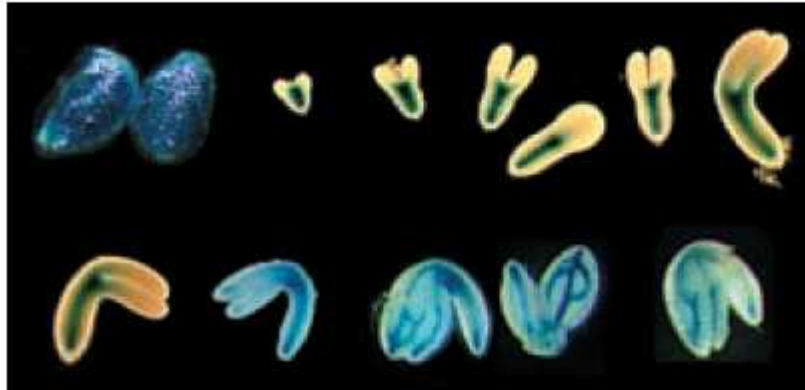
(C) Fiore aperto



(D) Siliqua matura con semi

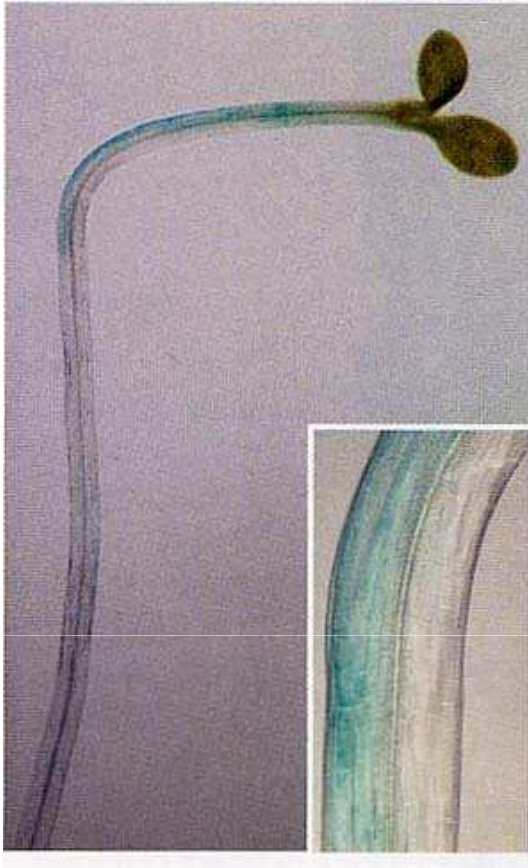


(E) Embrioni in sviluppo



GA1 codifica per CPS (ent-copalil difosfato sintasi) → biosintesi gibberelline

Studio dell'espressione di un promotore



pianta *Arabidopsis* trasformata con il
costrutto **DR5::GUS**

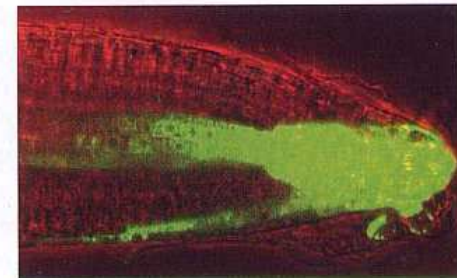
DR5 = promotore gene *GH3*
(indotto da auxina)

pianta *Arabidopsis* trasformata
con il costrutto **DR5::GFP**

(B)



(C)



Localizzazione cellulare di una proteina

espressione transiente di una proteina di fusione con la GFP



vettore virale

sistema biolistico

GFP-peptide
di secrezione
nell'apoplasto

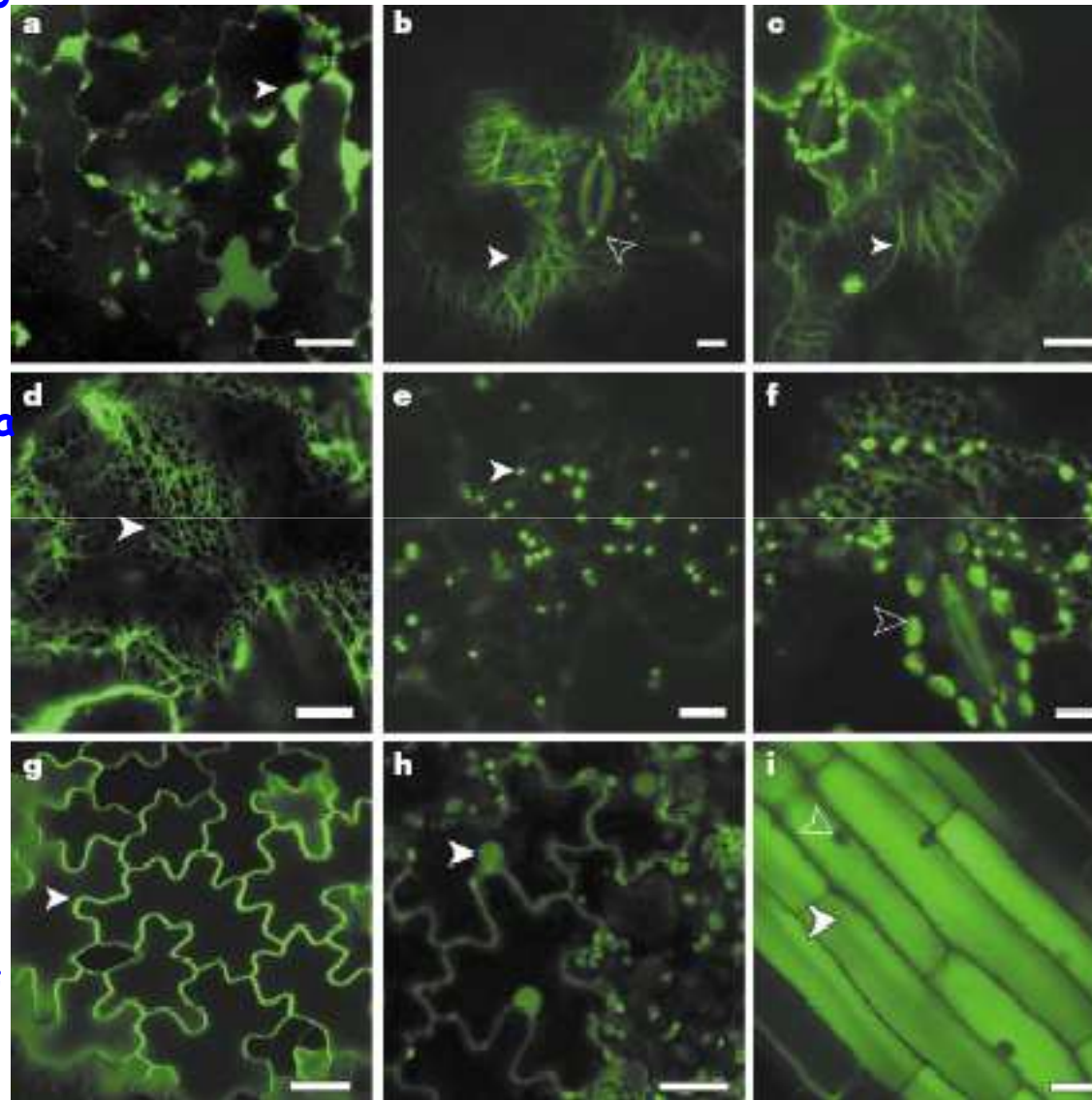
GFP-tubulina

GFP-dominio di
legame all'actina
della talina

GFP-calreticulina
di mais (ER)

GFP-HDEL
recettore
(Golgi)

GFP-peptide di
membrana
plasmatica



FRET - Fluorescence Resonance Energy Transfer

Permette di studiare le **interazioni proteina-proteina** a livello cellulare

Fenomeno che avviene quando due cromofori (accettore e donatore) hanno gli spettri di assorbimento ed emissione parzialmente sovrapposti

Il trasferimento di energia dipende dalla distanza tra le due proteine

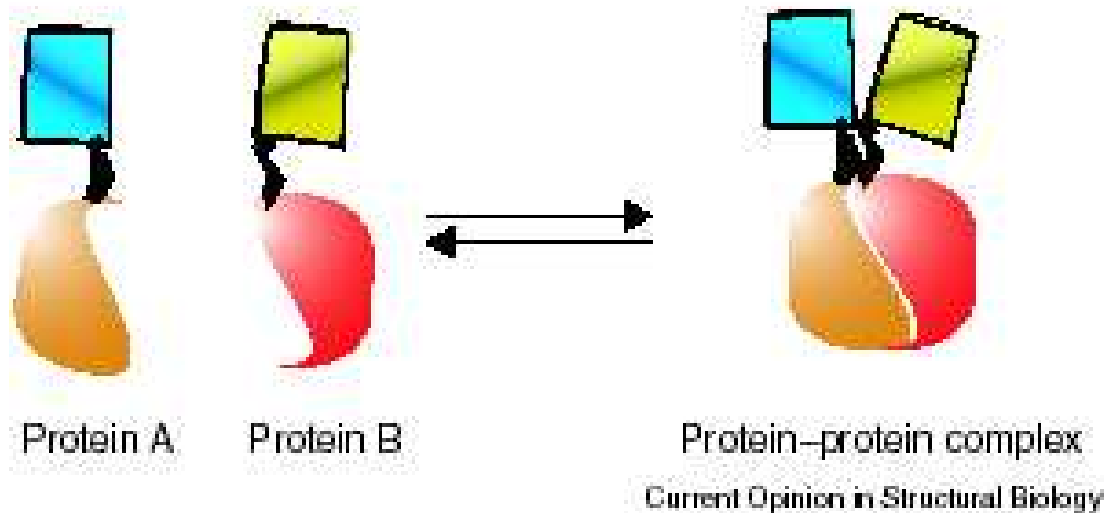
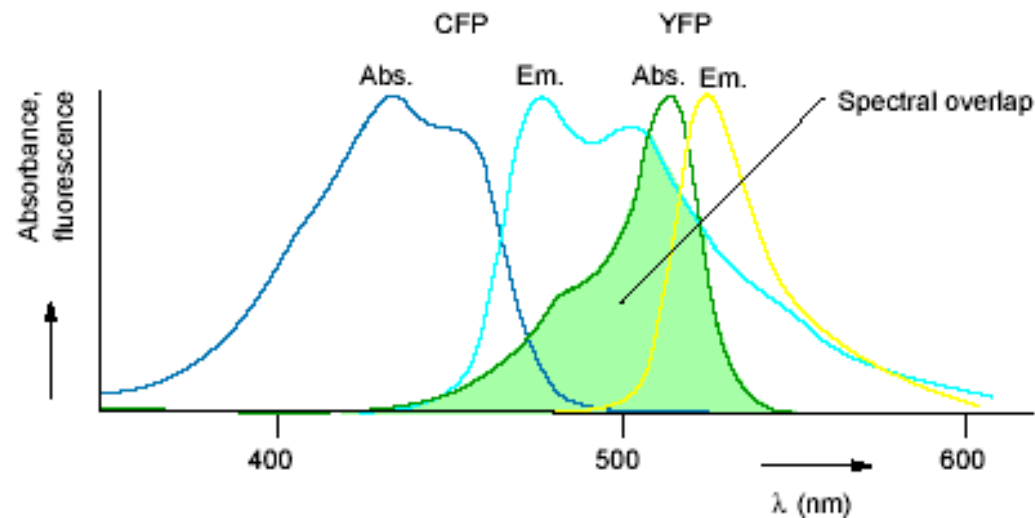


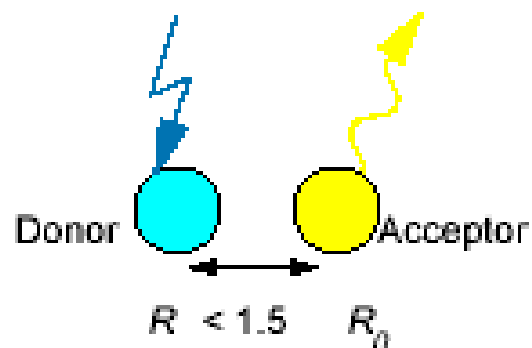
Table 1 | **Examples of fluorescent proteins commonly used in plants**

Fluorescent protein	Amino-acid substitutions with respect to wild-type GFP	Absorbance/ emission (nm)
Wild type GFP	(Chromophore: S65–Y66–G67)	396,475/508
mGFP5	V163A, I167T, S175G,	400,475/508
mCFP	Y66W,V163A,S175G	440/485
mYFP	S65G,S72A,V163A,I167T,S175G,T203Y	514/527
RsGFP	S65G,S72A	505/522
EGFP	F64L,S65T, _a	488/507
ECFP	K26R,F64L,S65T,Y66W,N146I,M153T,V163A,N164H,N212K, _a	434/474
EYFP	S65G,V68L,S72A,T203Y, _a	514/527
DsRed	–	558/583

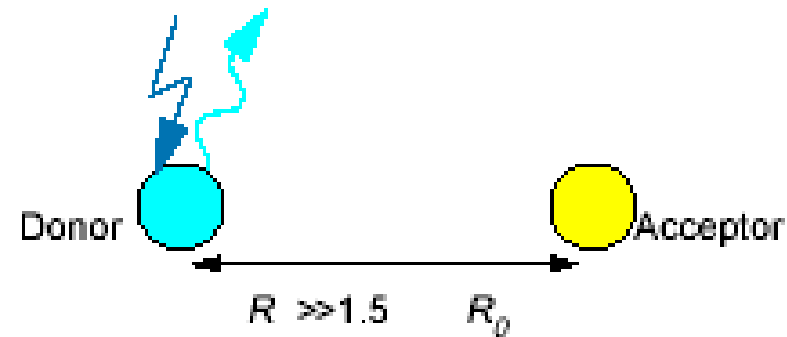


Lo spettro di emissione della CFP è parzialmente sovrapposto allo spettro di eccitazione della YFP

Il trasferimento di energia si osserva se la distanza tra i due fluorofori è inferiore alla distanza di Förster



FRET: donor is excited and acceptor fluoresces



No FRET: donor is excited and donor fluoresces

